



HAL
open science

Impacts de la gestion de la phase aqueuse du caillé sur le développement des qualités fonctionnelles et sensorielles des fromages à pâte pressée non cuite

Émilien Delorme

► To cite this version:

Émilien Delorme. Impacts de la gestion de la phase aqueuse du caillé sur le développement des qualités fonctionnelles et sensorielles des fromages à pâte pressée non cuite. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCK028 . tel-03418762

HAL Id: tel-03418762

<https://theses.hal.science/tel-03418762v1>

Submitted on 8 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

IMPACTS DE LA GESTION DE LA PHASE AQUEUSE DU CAILLÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DES QUALITÉS FONCTIONNELLES ET SENSORIELLES DES FROMAGES À PÂTE PRESSÉE NON CUITE

Préparée à INRAE-URTAL de Poligny

Présentée à l'Université de Bourgogne-Franche-Comté par

ÉMILIE DELORME

Pour l'obtention du grade de Docteur
Spécialité : Biotechnologies agro-alimentaires

Soutenue le 18 mai 2021

Président du jury

Rémi Saurel, *Professeur, AgroSup-Dijon, Dijon, France*

Rapporteurs

Geneviève Gésan-Guiziou, *Directrice de recherche, INRAE, Rennes, France*

Joël Scher, *Professeur, Université de Lorraine, Vandœuvre-les-Nancy, France*

Examineurs

Frédéric Gaucheron, *Chargé de recherche, CNIEL, Paris, France*

Henry-Éric Spinnler, *Professeur, AgroParisTech, Grignon, France*

Directeur de thèse

Éric Beuvier, *Ingénieur de recherche, INRAE, Poligny, France*

Co-encadrement de thèse

Christine Achilleos, *Ingénieure de recherche, INRAE, Poligny, France*

Remerciements

Je tiens à remercier le groupe de travail DELAC du CNIEL pour son soutien financier au projet, qui m'a permis de réaliser mon travail de thèse.

Je remercie INRAE-URTAL de Poligny de m'avoir accueilli pendant ces 3 années. Je remercie en particulier mes encadrants de thèse, Éric Beuvier et Christine Achilleos pour leur accompagnement dans mon projet et le partage de leur expertise. Je remercie les ingénieurs et techniciens qui ont travaillé sur ce projet avec enthousiasme, Sylvie Pochet, Odile Rolet-Répécaud, Floriane Revardeau, Pascal Barbet, Fabrice Petitpas, Marie-Hélène Duployer, Romain Palme et Marie-Odile Coquillard.

Je remercie mes collègues d'ACTALIA, notamment Philippe Trossat et Benoît Paysant qui m'ont accompagné tout au long du projet et m'ont fait profiter de leur expertise, ainsi que Stéphane Gavoye. Je remercie Aurore Oudotte et Maud Milloux de CECALAIT, Jean-Christophe Perrin et son équipe d'ACTALIA Sensoriel ainsi que Romain Richoux et son équipe d'ACTALIA Produits laitiers.

Je remercie Yves Gaüzère de l'ENILBio pour son implication dans la création et la mise en œuvre du projet, ainsi que pour le partage de son expertise. Je remercie également Fabrice Buchin, Malvina Sornay et Fabienne Groualle pour leur collaboration lors des fabrications expérimentales et des analyses des échantillons.

Je remercie les membres de mon Comité Scientifique de Suivi de Thèse, Frédéric Gaucheron et Henri-Éric Spinnler, pour leurs précieux conseils.

Je remercie les membres du jury de thèse, Geneviève Gésan-Guiziou, Joël Scher, Rémi Saurel, Frédéric Gaucheron et Henri-Éric Spinnler, qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie l'équipe de l'UMR GABI, Guy Miranda, Leonardo Bianchi et Agnès Delacroix-Buchet qui ont pris part au projet avec l'analyse des fractions caséiques.

Je remercie Élodie Noirot, Christine Arnould, et Laure Avoscan de Dimacell qui ont pris part au projet avec l'analyse de la microstructure du fromage par microscopie confocale.

Je remercie Thierry pour son aide importante à la mise en page de cette thèse.

Je remercie Fabienne et Marie d'avoir pris le temps de faire une dernière relecture de ce mémoire.

Je remercie Édouard, Benoît, Floriane et Nicolas qui m'ont apporté leur soutien par leur amitié.

Je remercie Marie, ma compagne, pour son soutien inébranlable au quotidien.

Résumé

L'industrie fromagère tient une place de premier plan dans l'économie française. Cependant, pour rester concurrentielle, elle doit pouvoir à la fois adapter ses produits aux exigences des consommateurs et optimiser ses procédés pour en maximiser la rentabilité. Dans la catégorie des fromages à pâte pressée non cuite, le délactosage est une étape importante de la fabrication pour le développement des qualités du fromage, mais qui est coûteuse en ressources. Il est réalisé la plupart du temps entre le décaillage et le soutirage de la cuve et consiste à retirer une partie du lactosérum et à diluer le mélange caillé-lactosérum restant avec de l'eau. Cette opération diminue la concentration en solutés du caillé (lactose, minéraux, protéines solubles...) et est indispensable pour développer les qualités désirées de fromages à pâte pressée non cuite comme la Raclette. Cependant, les mécanismes par lesquels le délactosage contribue au développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage sont peu connus. L'étude de ces mécanismes permettrait d'une part, d'optimiser le contrôle du développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage et d'autre part, d'identifier les paramètres permettant de réduire les ressources nécessaires.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier l'impact du délactosage sur le développement des caractéristiques du fromage au démoulage et en fin d'affinage à travers deux paramètres : le niveau et le mode de délactosage. Le niveau traduit l'intensité de la dilution et le mode représente les quantités de lactosérum retiré et d'eau ajoutée pour atteindre un niveau de délactosage donné. Les impacts de ces paramètres ont été étudiés au cours de fabrications pilotes en ciblant des teneurs en matière sèche similaires dans tous les fromages afin d'étudier spécifiquement l'impact de la composition de la phase aqueuse. L'analyse du caillé (matières azotées, matière grasse, minéraux, sucres, acides organiques, capacité tampon, populations bactériennes, activités protéasiques) et de sa phase aqueuse au cours de la fabrication a permis d'étudier l'impact du délactosage sur les caractéristiques du fromage au démoulage. L'analyse du fromage affiné (propriétés rhéologiques, culinaires, sensorielles et microstructure), quant à lui, a permis d'étudier l'impact du délactosage sur le développement des qualités finales du fromage.

Le niveau de délactosage est le principal paramètre contribuant au développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage. La dilution de la phase aqueuse du caillé entraîne une diminution de la concentration en sucres fermentescibles et donc un pH plus élevé du fromage, ainsi qu'un pouvoir tampon plus faible du fromage au démoulage. Le pouvoir tampon plus faible favorise une augmentation du pH plus rapide pendant l'affinage. Un pH plus élevé favorise une protéolyse plus rapide et une solubilisation du calcium associé aux caséines plus lente, menant au développement d'une matrice fromagère à la fois plus souple et plus résistante. Le mode de délactosage affecte peu les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage, et cela ouvre la perspective de moduler les caractéristiques du fromage affiné en ajustant le niveau de délactosage tout en optimisant économiquement l'étape de délactosage avec le mode.

Mots-clés : Délactosage, phase aqueuse, fromage à pâte pressée non cuite, protéolyse, propriétés fonctionnelles, propriétés sensorielles

Abstract

Cheese industry holds a prominent place in the French economy, but to remain competitive, it must be able to both adapt its products to consumer expectations and optimize its processes in order to be able to produce at a lower cost. In semi-hard cheese varieties, whey dilution is precisely an important manufacturing step for the development of the qualities of cheese, but which is costly in terms of resources. It is carried out most of the time between the cutting of the coagulum and the drainage of the vat and involves a removal of a part of the whey and an addition of water to dilute the remaining curd-whey mixture. This operation decreases the concentration of solutes in the curd (lactose, minerals, soluble proteins...) and is essential to develop the desired qualities of cheeses such as Raclette. However, the mechanisms by which whey dilution takes part to the development of the functional and sensory properties of cheese are poorly understood. The study of these mechanisms would enable in one hand to optimize the control of the development of these properties and on the other hand to identify the parameters allowing to reduce the required.

The objective of this thesis is therefore to study the impact of whey dilution on the development of cheese characteristics at the beginning and at the end of the ripening through two parameters: level and mode. The level reflects the intensity of the dilution and the mode represents the amounts of whey removed and water added to reach a level of dilution. The impacts of these parameters have been studied during pilot cheese productions by targeting similar dry matter contents in all cheeses in order to specifically study the impact of the composition of the aqueous phase. The analysis of the curd (nitrogenous matter, fat, minerals, sugars, organic acids, buffering capacity, bacterial populations, protease activities) and of its aqueous phase enabled to study the impact of whey dilution on the characteristics of the cheese at the beginning of the ripening. The analysis of the ripened cheese (rheological, culinary, sensory properties and microstructure) enabled to study the impact of whey dilution on the development of cheese qualities.

The level is the main parameter contributing to the development of the functional and sensory properties of cheese. Dilution of the aqueous phase of the curd results in a decrease in the

concentration of fermentable sugars and therefore a higher pH of the cheese, as well as a lower buffering capacity, which both contributes to the increase in pH during ripening. The increase in pH promotes faster proteolysis and slower solubilization of calcium associated with caseins, leading to the development of a cheese matrix that is both soft and resistant. The mode has little effect on the functional and sensory properties of cheese, and this opens up the perspective of modulating the qualities of the cheese with the level while economically optimizing the whey dilution step with the mode.

Key words: curd washing, whey dilution, aqueous phase, semi-hard cheese, proteolysis, functional properties, sensory properties.

Liste des abréviations

a_w : activité de l'eau (activity of water)

Ca : calcium

Ca INSOL : phosphate de calcium associé aux caséines

Cf : contrainte à la fracture

CMP : caséino-macropéptide

CUVC : compression uniaxiale à vitesse constante

Df : déformation à la fracture

DO : densité optique

E : % d'eau ajouté dans la cuve par rapport à la quantité initiale de lait

ESD : extrait sec dégraissé

EST : extrait sec total

FMAR : flore mésophile aérobie revivifiable

GPE : grandes porosités extramicellaires

GSV : groupe de soutirage sous vide

HR : humidité relative

LAB : bactéries lactiques

LBHF : lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

LEG : lactosérum extra-granulaire

LIG : lactosérum intra-granulaire

LS : % de lactosérum retiré de la cuve par rapport à la quantité initiale de lait

MAP : matière azotée protéique

MD : module de déformabilité

MG : matière grasse

MS : matière sèche

NPN : azote non protéique

NS : azote soluble

NSLAB : non starter lactic acid bacteria

NT : azote total

Pi : phosphate inorganique

PPE : petites porosités extramicellaires

SLAB : starter lactic acid bacteria

UFC : unité formant colonie

Wf : travail à la fracture

Table des matières

Introduction	18
Chapitre 1 Étude bibliographique	22
1 Le fromage.....	24
1.1 Définition générale	24
1.2 Les fromages à pâte pressée non cuite	24
2 Les étapes principales de la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite.....	27
2.1 Introduction	27
2.2 Le lait.....	28
2.2.1 La phase aqueuse	28
2.2.2 La phase colloïdale	28
2.2.3 La phase lipidique.....	29
2.3 Préparation du lait.....	30
2.4 Maturation du lait.....	32
2.5 Coagulation du lait.....	34
2.6 Le décaillage	35
2.7 Le travail du mélange caillé-lactosérum en cuve	35
2.8 Le délactosage	36
2.8.1 La dilution du lactosérum.....	36
2.8.2 Le rinçage du caillé	38
2.9 L'égouttage en moule et le démoulage.....	38
2.9.1 Impact de la dilution du lactosérum sur l'égouttage et l'acidification	39
2.9.2 Impact du rinçage du caillé sur l'égouttage et l'acidification	41
2.10 L'affinage.....	42

2.10.1	Le pH	42
2.10.2	L'évolution de la teneur en Ca INSOL	43
2.10.3	Métabolisme des lactates.....	45
2.10.4	La protéolyse	45
2.10.4.1	La protéolyse primaire.....	46
2.10.4.2	La protéolyse secondaire.....	48
2.10.5	Métabolisme des citrates	49
2.10.6	La matière grasse et la lipolyse.....	49
3	Les propriétés fonctionnelles	50
3.1	Développement des propriétés fonctionnelles.....	51
3.1.1	Les protéines et la protéolyse	51
3.1.2	Le pH.....	53
3.1.3	La teneur en Ca INSOL.....	54
3.1.4	La teneur en matière grasse.....	54
3.1.5	La teneur en humidité	55
3.1.6	La teneur en sel	55
3.2	Impacts du dé lactosage sur les propriétés fonctionnelles.....	56
4	Les propriétés sensorielles	57
5	Conclusion sur les impacts du dé lactosage sur les caractéristiques des fromages au démoulage et affinés.....	59
6	Objectifs scientifiques et stratégie.....	63
	Chapitre 2 Matériels et méthodes	70
1	Mise au point de l'échantillonnage en cuve	71
1.1	Fabrications fromagères.....	71
1.2	Séparation caillé/lactosérum.....	73
1.3	Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ?	73

1.4	Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner un échantillon hétérogène et instable ?	73
1.5	À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?	77
2	Expérimentations fromagères.....	80
2.1	Introduction.....	80
2.2	Trajectoires technologiques	81
2.2.1	Préparation du lait.....	81
2.2.2	Fabrication des fromages	81
2.2.3	Délactosage	81
2.2.4	Ajustement du temps de travail en cuve	82
2.2.5	Pressage.....	83
2.3	Suivi analytique.....	83
2.3.1	À réception du lait.....	83
2.3.2	Au cours de la fabrication	84
2.3.3	En début et en fin d'affinage.....	84
2.4	Plan de prélèvement.....	87
2.4.1	Prélèvements et échantillonnage du caillé et lactosérum en cuve	87
2.4.2	Prélèvements des échantillons de fromage.....	88
2.4.3	Récupération du lactosérum.....	90
3	Analyses Statistiques.....	91
3.1	Etude de l'effet « jour ».....	91
3.2	Impacts des facteurs sur les variables mesurées	91
3.3	Détermination de la significativité de la différence entre deux populations bactériennes.....	93
3.4	Impacts des variables quantitatives entre elles	93

3.4.1	Coefficient de corrélation	93
3.4.2	Analyse en Composantes Principales (ACP)	94
3.5	Études de cinétiques.....	94
3.6	Régression PLS	94
4	Analyses.....	94
4.1	Répartition analytique	94
4.2	Techniques analytiques	95
4.2.1	Caractérisation physico-chimique.....	95
4.2.1.1	Matière sèche (MS)	95
4.2.1.2	Matière grasse (MG).....	96
4.2.1.3	Sucres	96
4.2.1.4	Acides organiques	96
4.2.1.5	Minéraux	97
Préparation des échantillons.....	97	
Analyse chromatographique	97	
Estimation des teneurs en Ca INSOL	98	
4.2.1.6	pH	98
4.2.1.7	Pouvoir tampon.....	98
4.2.1.8	Activité de l'eau (a_w).....	99
4.2.1.9	Teneur en sel (NaCl)	99
4.2.2	Activités protéolytiques et fractions azotées.....	99
4.2.2.1	Activité plasmine/plasminogène.....	99
4.2.2.2	Activité des protéases acides (aspartiques).....	100
4.2.2.3	Fractions azotées.....	100
4.2.2.4	Profil peptidique.....	101
4.2.2.5	Fractions caséiques	102
4.2.3	Microbiologie	102
4.2.3.1	Suivi analytique	102
4.2.3.2	Analyses des bactéries pathogènes.....	103
4.2.3.3	Analyse microbiologique de l'eau	103
4.2.4	Cellules somatiques.....	104

4.2.5	Propriétés fonctionnelles	104
4.2.5.1	Propriétés fonctionnelles à température ambiante : propriétés rhéologiques.....	104
4.2.5.2	Aptitudes culinaires	104
	Étalement	104
	Exsudation d'huile	105
	Élasticité à chaud.....	105
	Filant.....	105
	Colorimétrie en conditions gratinantes.....	106
4.2.6	Analyses sensorielles.....	106
4.2.7	Microstructure	107
Chapitre 3 Résultats et discussions.....		108
1	Mise au point de l'échantillonnage en cuve	109
1.1	Introduction	109
1.2	Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ?	110
1.2.1	Objectif 1 : détermination d'un temps de tamisage pour la séparation du caillé et du lactosérum	110
1.2.1.1	Étude du débit d'écoulement du lactosérum pendant le tamisage du caillé	110
1.2.1.2	Étude de l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis au cours de la séparation	115
1.2.1.3	Conclusion sur la séparation du caillé et du lactosérum.....	117
1.2.2	Objectif 2 : détermination du volume de prélèvement du mélange caillé-lactosérum.....	117
1.2.2.1	Quantités de caillé.....	118
1.2.2.2	Quantités similaires de caillé entre les prélèvements avant et après délactosage	118
1.2.2.3	Impact du changement de volume de prélèvement sur le tamisage.....	119
1.2.2.4	Conclusion	120
1.3	Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner le caillé tamisé ?	121
1.3.1	Objectif 1 : choix d'un couple de mixage vitesse/durée.....	121
1.3.2	Objectif 2 : détermination de l'impact du refroidissement du caillé tamisé avant mixage sur l'homogénéité des sous-échantillons	122

1.3.3	Objectif 3 : comparaison entre deux méthodes de sous-échantillonnage : par mixage du caillé tamisé et par répartition du caillé tamisé non mixé	124
1.3.4	Conclusion sur la méthode de sous-échantillonnage	125
1.4	Volet 3 : Comment prélever le mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement ?	125
1.4.1	Détermination de la voie de prélèvement du mélange caillé-lactosérum	126
1.4.2	La rotation des brassoires de la cuve	127
1.4.3	Détermination du sens de prélèvement du mélange caillé-lactosérum.....	128
1.4.4	Conclusion sur la méthode de prélèvement	128
1.5	À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?	129
2	Validation des conditions expérimentales	131
2.1	Introduction	131
2.2	Composition et qualité sanitaire du lait	131
2.3	Objectifs de niveaux de délactosage	133
2.4	Objectif de teneur en MS	133
2.5	Absence d'un effet jour	134
3	Impact du délactosage sur les dynamiques observées en cuve et sur les caractéristiques du fromage au démoulage	135
3.1	Introduction	135
3.2	Extrait sec dégraissé	138
3.3	Sucres.....	139
3.3.1	Lactose.....	140
3.3.2	Glucose et galactose.....	143
3.4	Acide lactique	146
3.5	Lactocoques et leuconostocs	147

3.6	pH.....	148
3.7	Calcium et phosphore.....	150
3.7.1	Totaux.....	150
3.7.2	Solubles	153
3.8	Citrates.....	155
3.9	Le pouvoir tampon	157
3.10	Indices de protéolyse et activités enzymatiques.....	158
3.11	Rhéologie	159
3.12	Microstructure	160
3.13	Rendements	163
4	Impact du dé lactosage sur la composition et la structure du fromage affiné.....	166
4.1	Introduction	166
4.2	Matière sèche et matière grasse	167
4.3	pH.....	168
4.4	Populations bactériennes	170
4.5	Protéolyse	172
4.6	Microstructure.....	175
5	Impacts sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné.....	179
5.1	Propriétés fonctionnelles	179
5.1.1	Propriétés fonctionnelles à température ambiante : compression uniaxiale à vitesse constante.....	180
5.1.2	Propriétés fonctionnelles à chaud : aptitudes culinaires.....	185
5.2	Propriétés sensorielles	190
5.2.1	Analyse sensorielle à température ambiante	190
5.2.2	Analyses sensorielles à chaud	196
	Chapitre 4 Conclusion générale et perspectives	201

1	Conclusion générale	202
2	Perspectives.....	211
	Annexes.....	219
	Références bibliographiques.....	237
	Index des tableaux.....	247
	Index des figures.....	250

Introduction

La filière laitière tient une place de premier plan dans l'économie française. Avec un chiffre d'affaire de 30 milliards d'euros en 2016, elle est le deuxième secteur agro-alimentaire français derrière la filière viande (Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière, 2019). Avec une production de 1,9 millions de tonnes de fromage en 2016, les fromages à pâte pressée représentent 30 % de ce volume. Cette production place la France au rang de 3^e producteur mondial de fromages derrière les États-Unis (5,7 millions de tonnes) et l'Allemagne (2,2 millions de tonnes).

Pour rester concurrentielle au niveau mondial, l'industrie fromagère française doit pouvoir adapter la qualité de ses produits aux exigences du marché. Elle doit également pouvoir proposer ses produits à des prix compétitifs, et pour cela il est nécessaire de maîtriser les coûts de production en réduisant au minimum les ressources nécessaires. Ces deux enjeux nécessitent d'améliorer la maîtrise technologique des étapes du processus de fabrication, et cela implique une connaissance précise des impacts des paramètres de fabrication sur les mécanismes de développement des propriétés du fromage.

Le fromage se caractérise par ses propriétés fonctionnelles (déformabilité, souplesse, élasticité...) et sensorielles (texture, goût, odeur, aspect). Les propriétés fonctionnelles et de texture sont liées à l'organisation du réseau de caséines de la matrice du fromage, dans lequel le calcium et le phosphore jouent un rôle structural important sous forme de complexes phosphocalciques liés aux caséines. Les propriétés sensorielles de flaveur (goût et odeur) sont liées à la production de molécules aromatiques au cours de l'affinage par la microflore du fromage et l'action d'enzymes. Le pH joue un rôle central dans le développement de ces propriétés car il détermine la vitesse de solubilisation du calcium et du phosphore qui sont liés aux caséines ainsi que l'activité de la microflore et des enzymes. Le pH est lui-même conditionné par la quantité d'acide lactique produite suite à la fermentation du lactose par les bactéries lactiques. Pour ces raisons, la gestion de l'acidification est un point clé du développement des qualités fonctionnelles et sensorielles du fromage.

De manière générale, l'acidification est maîtrisée par deux paramètres de fabrication : 1) le type et la quantité de bactéries lactiquesensemencées et 2) l'égouttage du caillé, qui élimine

le lactose avec la phase aqueuse dans lequel il est soluble. Le lactose et la phase aqueuse étant liés, l'égouttage nécessaire à certaines variétés fromagères ne permet pas d'éliminer suffisamment de lactose pour éviter la post-acidification. En effet, le développement des propriétés de certaines variétés fromagères comme le Saint-Paulin, la Raclette, le Gouda et dans certains cas l'Emmental nécessite de conserver des teneurs en humidité différentes (52 %, 48 %, 42 % et 40 %, respectivement) avec un pH au démoulage proche de 5,2. Pour parvenir à contrôler ces deux paramètres, la teneur en lactose du caillé est maîtrisée en diluant sa phase aqueuse pendant la fabrication par ajout d'eau dans la cuve ou par rinçage du caillé égoutté : cette étape s'appelle le délactosage.

Bien que la gestion du lactose soit le principal objectif du délactosage, il n'est pas le seul élément affecté. Les autres solutés le sont également et la modification de l'acidification a des conséquences sur les caractéristiques physico-chimiques et la composition des fromages au démoulage et par conséquent sur le déroulement de l'affinage. En effet, la phase aqueuse du caillé contient également des acides organiques, des minéraux solubles, des protéines sériques, des enzymes ou activateurs d'enzyme qui sont susceptibles d'être affectés. Cependant, les impacts du délactosage sur ces composés sont peu décrits et leurs conséquences, notamment sur le fromage au démoulage et en fin d'affinage, restent à approfondir. Pendant l'affinage, il est connu que le pH du fromage conditionne les activités enzymatiques et la vitesse de solubilisation des minéraux liés aux caséines. Cependant, la façon dont le délactosage affecte la minéralisation du fromage et les activités enzymatiques au cours de l'affinage est peu décrit. Or, ces informations sont cruciales pour comprendre et maîtriser le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné.

Pour améliorer ces connaissances, le projet DELAC a été proposé par l'Unité Mixte Technologique FROM'CAPT au Comité National Interprofessionnel de l'Économie Laitière (CNIEL) pour le soutenir financièrement. Le projet a été mis en œuvre par trois partenaires de l'UMT : INRAE, ACTALIA et ISBA-ENILBio de Poligny, ainsi que par l'unité de recherche OPAALE (INRAE-Rennes). Cependant, les travaux de l'unité OPAALE qui visaient à explorer les outils RMN (haut champ et bas champ) et IRM pour étudier les transferts d'eau et de lactose entre le grain de caillé et le lactosérum ne figurent pas dans la thèse.

La thèse a été financée par ACTALIA et encadrée par l'URTAL-INRAE de Poligny. Elle s'est déroulée en trois phases :

- Phase 1 : Étude bibliographique

Objectifs : Décrire les protocoles de dé lactosage étudiés dans la littérature scientifique et leurs impacts pendant la fabrication et l'affinage du fromage. Identifier les trous de connaissances.

- Phase 2 : Mise au point de l'échantillonnage

Objectif : Développer une méthode d'échantillonnage du caillé en cuve permettant de suivre sa composition en solutés.

- Phase 3 : Réalisation de fabrications fromagères expérimentales

Objectif : Étudier les impacts du dé lactosage sur l'évolution de la composition du caillé pendant la fabrication, sur la composition du fromage au démoulage et sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage en fin d'affinage.

Les travaux réalisés pendant cette thèse sont présentés dans ce manuscrit en 4 chapitres :

Le 1^{er} chapitre présente les résultats de l'étude bibliographique sur le développement des caractéristiques des fromages à pâte pressée non cuite, les protocoles de dé lactosage existants et leurs impacts sur les caractéristiques de ces fromages.

Le 2^e chapitre décrit les matériels et méthodes utilisés pour la mise au point de l'échantillonnage de la phase 2 et la réalisation des fabrications fromagères expérimentales de la phase 3.

Le 3^e chapitre est consacré à la description et à la discussion des résultats de la mise au point de l'échantillonnage du caillé en cuve ainsi que des résultats obtenus à l'issue des fabrications fromagères expérimentales.

Dans le 4^e chapitre, l'ensemble des résultats issus des expérimentations fromagères est discuté afin de décrire les mécanismes de développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage et des perspectives sont proposées. L'impact économique du changement de mode de dé lactosage est présenté.

Chapitre 1

Étude bibliographique

1 Le fromage

1.1 Définition générale

Le fromage est un aliment défini par le décret du Journal Officiel de la République Française n°2013-1010 du 12 novembre 2013. Selon ce décret, « *la dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitières suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la phase aqueuse* ». Ce décret stipule également que sa teneur en matière sèche (MS) doit être au minimum de 23 grammes pour 100 grammes de fromage. La teneur en MS d'un lait étant de 12,5-13 g pour 100 grammes en moyenne, la fabrication du fromage doit donc au moins comprendre une étape d'égouttage.

Cette définition permet de nombreuses possibilités quant à la composition du fromage mis sur le marché et la manière dont elle est obtenue : près de 400 variétés ont été décrites (McSweeney *et al.*, 2017). La diversité des variétés fromagères repose en premier lieu sur la nature de la matière première utilisée ; à la fois en termes d'origine, c'est-à-dire l'espèce laitière (vache, brebis, chèvre, bufflonne...) mais également de nature de la fraction utilisée comme matière première : lait entier ou écrémé, lactosérum, crème... Cette diversité repose également sur les étapes technologiques par lesquelles le lait ou la fraction du lait utilisée sont transformés en fromage : coagulation, égouttage, acidification, affinage. Par exemple, le type et la quantité de micro-organismes utilisés pour ensemer le lait, le type de coagulation, la façon d'égoutter et de travailler le caillé, la façon d'affiner sont autant de choix technologiques qui conditionnent le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles d'une variété fromagère.

1.2 Les fromages à pâte pressée non cuite

Cette étude s'est focalisée sur les variétés fromagères de type « pâte pressée non cuite ». Ce terme est utilisé dans la classification française qui repose sur les étapes technologiques telles que (Almena-Aliste & Mietton, 2014) :

- **Le type de coagulation** : lactique (coagulation par acidification importante du lait), présure (coagulation par ajout d'un coagulant enzymatique) ou mixte, majoritairement,
- **Le type d'égouttage** et opérations liées : pressage, cuisson, etc,
- **Le salage** : salage du caillé égoutté et broyé, salage par saumurage,
- **Des opérations caractéristiques** : filage (dans le cas de la Mozzarella),
- **Certaines caractéristiques d'affinage** : type de croûte (lavée, fleurie...), présence de moisissures internes (bleus), favorisation des ouvertures (ensemencement par bactéries propioniques) etc.

Cependant, la littérature scientifique utilise préférentiellement la classification anglo-saxonne, basée sur les propriétés texturales du fromage : soft, semi-hard, hard, very hard (McSweeney *et al.*, 2017). Le cadre de notre étude doit donc être fixé en tenant compte des deux schémas de classification.

Selon les correspondances établies entre les deux classifications (Lenoir *et al.*, 1985; Noel & Lefier, 1991), les variétés fromagères à pâte pressée non cuite peuvent être assimilées aux fromages dits « semi-hard ». En revanche, toutes les variétés de fromage « semi-hard » ne possèdent pas les mêmes caractéristiques ni les mêmes propriétés que les fromages rentrant dans le cadre de notre étude. Par exemple, le Maasdammer et l'Emmental peuvent être qualifiés de fromages « semi-hard ». Cependant, dans la nomenclature française, ces variétés sont qualifiées de fromages à « pâte pressée semi cuite » ou « cuite » (Almena-Aliste & Mietton, 2014). Elles ont subi un chauffage plus intense (~40-45 °C pour les pâtes semi cuites et ~45-55 °C pour les pâtes cuites) ayant entraîné un égouttage plus important (teneur en MS autour de 60 %) (Hartmann *et al.*, 2018). D'importantes différences de texture et de goût sont attendues entre les variétés Emmental et Raclette, par exemple, qui nécessitent toutes les deux une étape de délactosage dans leur fabrication.

Almena-Aliste & Mietton (2014) ont proposé une nomenclature rassemblant les schémas français et anglo-saxon (Figure 1). Dans cette nomenclature, les fromages entrant dans le cadre de cette étude sont qualifiés de « Pressed uncooked semihard cheese ».

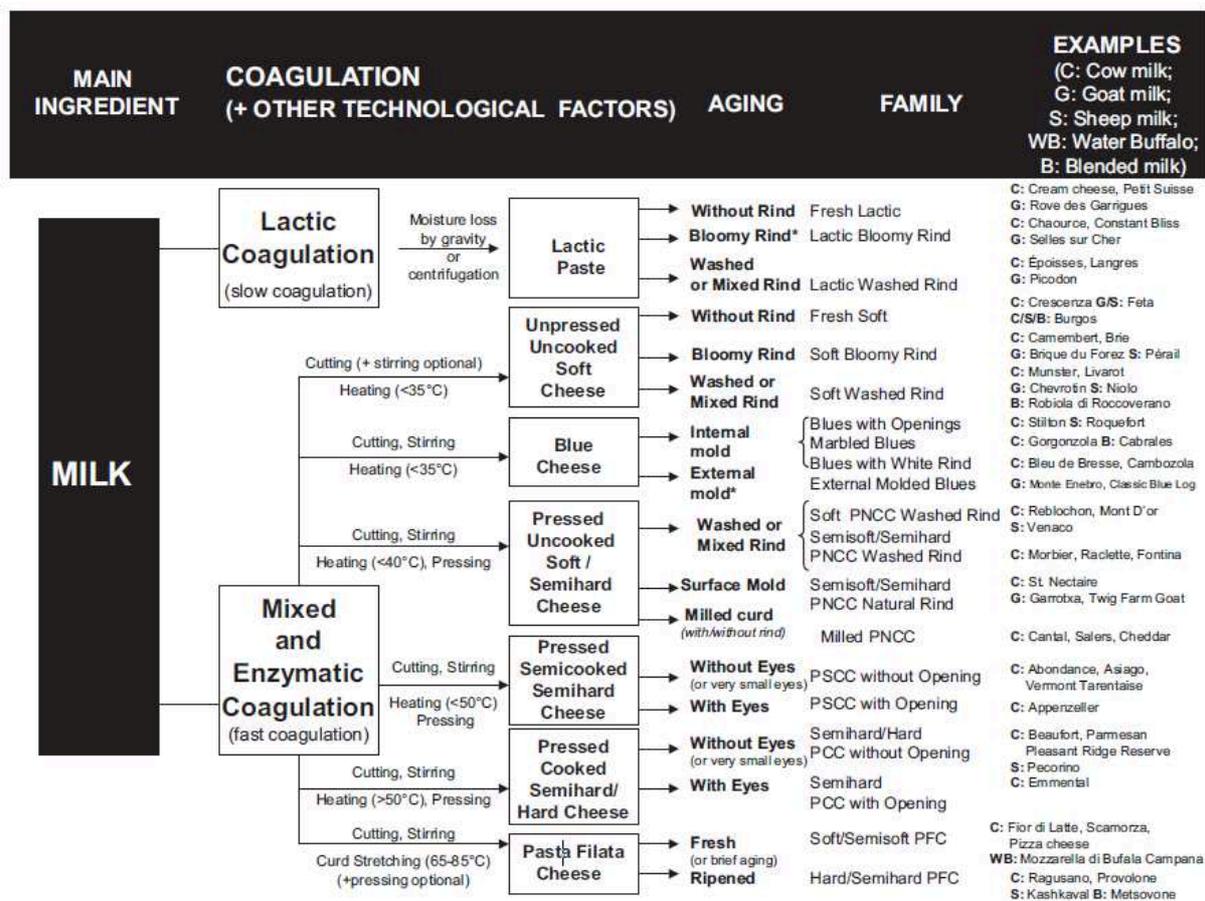


Figure 1 : Nomenclature des variétés fromagères à coagulations lactique, enzymatique et mixte proposée par Almena-Aliste & Mietton (2014). PNCC = pressed noncooked cheese, PSCC = pressed semicooked cheese, PCC = pressed cooked cheese, PFC = pasta filata cheese.

L'impact du délactosage sur le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage doit donc être interprété dans le cadre de ces paramètres de fabrication. Ainsi, le fromage concerné par cette étude est fabriqué à partir de lait de vache avec une coagulation de type « présure ». Le type d'ensemencement est important pour le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles : les levains utilisés sont des bactéries lactiques mésophiles. Il est égoutté par chauffage à 35 °C puis pressé pour atteindre une teneur en MS entre 50 et 55 % au démoulage. Le fromage est salé au démoulage par saumurage. Parmi les variétés concernées on retrouve par exemple, le Saint-Paulin, la Raclette, le Morbier, le Gouda et l'Edam.

2 Les étapes principales de la fabrication des fromages à pâte pressée non cuite

2.1 Introduction

La transformation du lait en fromage à pâte pressée non cuite repose sur 4 étapes technologiques principales : la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage (Figure 2). Au cours des premières heures de la fabrication, le lait liquide est transformé en un produit solide par l'élimination d'une partie de son eau. Pour ce faire, le lait est coagulé en un gel appelé « coagulum », qui renferme l'intégralité de la phase aqueuse du lait. La découpe du coagulum

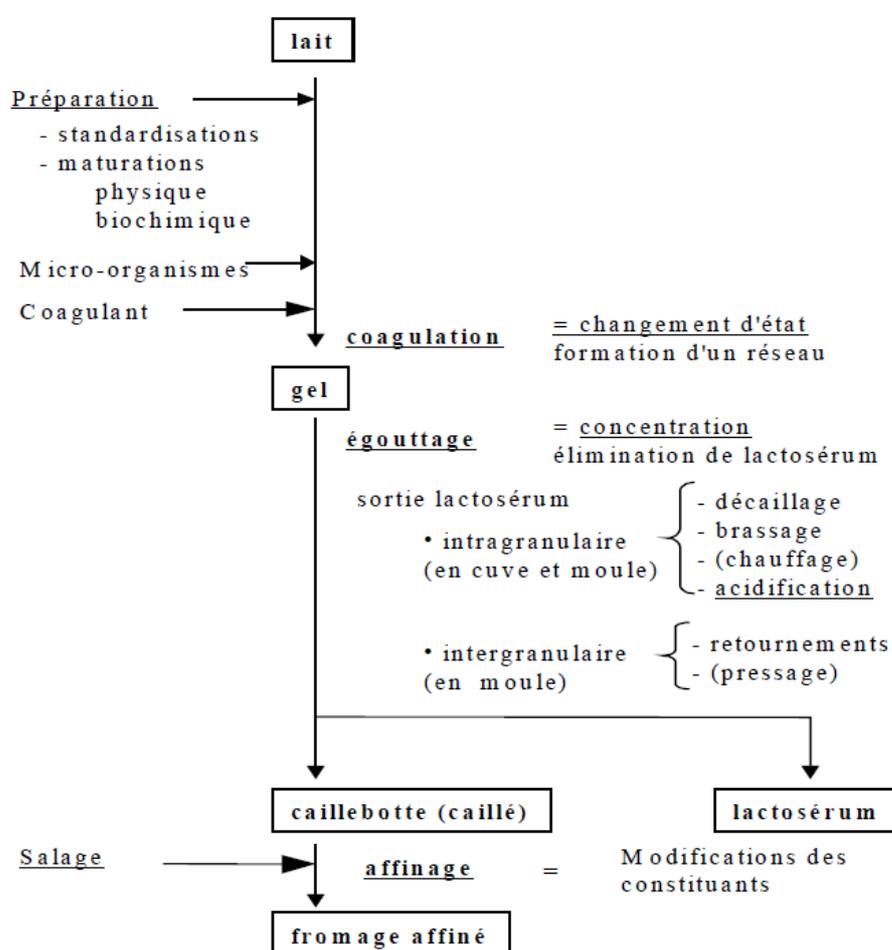


Figure 2 : Schéma général de la transformation du lait en fromage (Mietton *et al.*, 2004).

ou « décaillage » permet la libération d'une grande partie de cette phase aqueuse et facilite l'égouttage des morceaux de coagulum ou « grains de caillé ». L'ampleur de l'égouttage est gérée par le travail en cuve, c'est-à-dire par sa durée ainsi que par le brassage et la température du mélange caillé-lactosérum. Dans certains cas, une étape de délactosage est réalisée au cours du travail en cuve dans le but principal de réduire la teneur en lactose du

caillé et de limiter la production d'acide lactique résultant de sa dégradation par les bactéries lactiques. Le caillé est ensuite moulé puis pressé pour éliminer une part de la phase aqueuse restante dans le caillé. À la suite du pressage, l'égouttage est fortement ralenti et c'est à partir de ce moment que l'acide lactique produit par la fermentation du lactose se concentre dans le fromage et l'acidifie. Le fromage est ensuite salé par saumurage pour, entre autres, former sa croûte. Les propriétés du fromage se développent au cours de l'affinage au travers de modifications physico-chimiques et d'activités enzymatiques étroitement liées à l'acidification du fromage, et à partir des constituants qui n'ont pas été éliminés par l'égouttage.

2.2 Le lait

Le lait frais est naturellement composé de plusieurs phases :

2.2.1 La phase aqueuse

Cette phase contient les éléments solubles. Parmi ces éléments, on trouve un sucre, le lactose, des protéines solubles dites « sériques » et des minéraux (principalement Ca et P) (Tableau 1). Les citrates sont présents en majorité sous forme soluble (90 %) tandis qu'une plus faible proportion est associée aux micelles de caséine de la phase colloïdale (10 %) (Gaucheron, 2005).

2.2.2 La phase colloïdale

Cette phase est constituée de particules sphériques, les micelles (Figure 3), composées de protéines, les caséines, et de minéraux, principalement des groupements de phosphate de calcium. Il existe 4 types de caséines natives : les caséines α S1, α S2, β et κ . Les caséines ne sont pas présentes en quantités égales : les caséines principales sont les caséines α -S1 et les caséines β qui représentent 70-80 % des caséines (Tableau 1). Les caséines κ sont presque exclusivement présentes à la périphérie des micelles. Elles sont reliées aux autres caséines par leur partie N-terminale hydrophobe et porte à leur extrémité C-terminale un groupement caséino-macropéptide (CMP) hydrophile chargé négativement (Snappe *et al.*, 2010). Les

caséines κ confèrent ainsi une charge négative globale à la micelle, qui lui permet d'être hydratée à sa périphérie. Cette charge crée également une répulsion électrostatique entre les micelles qui se repoussent entre elles et les empêche de s'agréger, donnant à la phase colloïdale sa fluidité (Snappe *et al.*, 2010). Les caséines sont des phosphoprotéines car elles portent un groupement phosphate organique chargé négativement sur certains résidus sérine de leur chaîne d'acides aminés. À ces résidus phosphosérine sont liés par liaisons électrostatiques les groupements de phosphate de calcium inorganique, qui créent des « ponts » entre les caséines appelés « nanoclusters » (Figure 3). En se liant au résidu phosphosérine des caséines, les groupements de phosphate de calcium diminuent drastiquement la charge des résidus phosphosérine, augmentant ainsi les interactions hydrophobes entre elles. Par ce mécanisme, le phosphate de calcium est un élément structural important de la micelle.

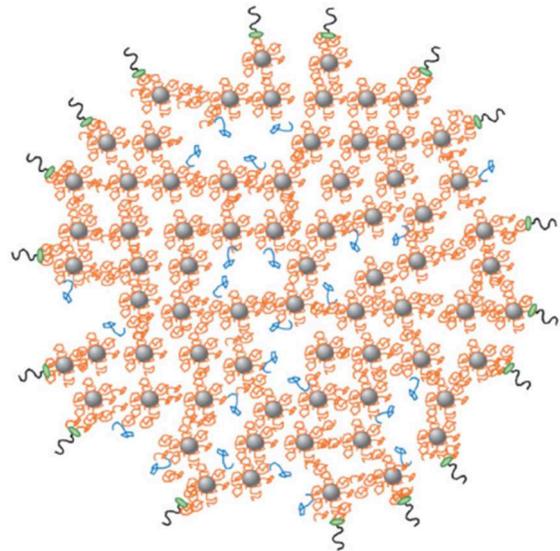


Figure 3 : Structure micellaire d'après Dalgleish & Corredig (2012), montrant les caséines α et β (orange), liées aux nanoclusters de phosphate de calcium (sphères grises), les β -caséines mobiles à liaisons hydrophobes (bleu), les para- κ -caséines (vert) et les caséino-macropéptides (noir).

2.2.3 La phase lipidique

Les globules gras sont entourés d'une membrane lipoprotéique qui assure leur intégrité. Cette membrane est chargée négativement à sa périphérie, conférant aux globules une répulsion électrostatique qui les maintient en état d'émulsion dans la phase aqueuse du lait.

Tableau 1 : Composition d'un litre de lait d'après Snappe *et al.*, (2010) et Cataldi *et al.*, (2003).

Eau		900 à 910 g	
Extrait sec		125 à 130 g	
Matière grasse		35 à 45 g	
Sucres	50 g		100 %
Lactose	47 à 52 g		99,90 %
Galactose	40 mg		0,08 %
Glucose	25 mg		0,05 %
Matières azotées	30 à 36 g	100 %	
Caséines	24 à 24 g	77 à 78 %	100 %
Caséines α-S1	9 à 11 g		36 %
Caséines β	9 à 11 g		34 %
Caséines α-S2	3 à 4 g		13 %
Caséines κ	3 à 4 g		10 %
Caséines γ 1, 2, 3	1 à 2 g		7 %
Protéines sériques	5 à 7 g	17 à 18 %	
Azote non protéique	1,5 g	5 à 6 %	
Minéraux		8,5 à 9,0 g	
Ca colloïdal		0,8 à 0,9 g	
Ca soluble		0,4 à 0,5 g	
P colloïdal		0,5 à 0,6 g	
P soluble		0,4 à 0,5 g	
Citrates		1,6 à 1,8 g	

2.3 Préparation du lait

L'objectif du fromager est de produire un fromage dont les propriétés fonctionnelles et sensorielles désirées sont constantes tout au long de l'année dans le cadre d'une fabrication industrielle. Le principal obstacle à cette constance est la variation saisonnière et géographique de la composition du lait (Lolkema, 1994). Pour cette raison, le lait est standardisé. En technologie fromagère, trois types de standardisation sont réalisées :

- **La standardisation microbiologique**, dont l'objectif est de réduire la population microbiologique globale tout en éliminant les bactéries pathogènes. Les microorganismes présents dans le lait sont exogènes et sont apportés, entre autres, par le contact entre le lait et le matériel de traite. Les principaux microorganismes du lait cru sont présentés dans le Tableau 2. En technologie fromagère, cette opération peut être réalisée par traitements thermiques (pasteurisation ou thermisation) dont

l'efficacité dépend du barème temps/température. Elle peut également être réalisée par microfiltration tangentielle avec une membrane dont la porosité est inférieure ou égale à 1,4 μm de diamètre.

Tableau 2 : Groupes microbiologiques et niveaux de population en unité formant colonie (UFC) par millilitres de lait frais (d'après Montel *et al.*, 2014).

Groupes microbiologiques	Niveaux des populations (UFC/mL)
<i>Staphylococcus</i> spp. et bactéries coryneformes	10^2 - 10^3
<i>Lactococcus</i> spp.	10^1 - 10^2
<i>Lactobacillus</i> spp.	10^1 - 10^2
<i>Leuconostoc</i> spp.	10^1 - 10^2
<i>Enterococcus</i> spp.	10^1 - 10^2
Bactéries propioniques	10^1 - 10^2
<i>Enterobacteriaceae</i>	10^1
<i>Pseudomonas</i> spp.	10^2 - 10^3
Levures	10^1 - 10^2
Moisissures	<10
Bactéries coliformes	<10

- **La standardisation chimique**, qui consiste principalement à ajuster les teneurs en protéines et matière grasse. La teneur en protéines est ajustée en ajoutant au lait de la poudre de protéines laitières déshydratées ou en ajoutant du rétentat de lait concentré par micro- ou ultrafiltration. La teneur en matière grasse est réduite par ajout de lait écrémé ou augmentée par ajout de crème. La teneur en calcium est parfois ajustée par ajout de CaCl_2 en fonction du barème de traitement thermique qui entraîne une perte de minéraux du lait.
- **La standardisation physique**, qui n'est pas systématique en technologie fromagère, peut consister à ajuster la couleur du lait par ajout de carotène pour obtenir une couleur orange, par exemple. La taille des globules gras peut également être homogénéisée en envoyant le lait sous pression dans une tête d'homogénéisation pour réduire la taille des plus gros globules gras. Cette opération entraîne la rupture des membranes des globules gras et favorise la lipolyse et donc l'apparition de goûts caractéristiques attendus dans certaines variétés fromagères telles que les Bleus.

Bien que peu répandue, la standardisation en lactose est possible par ultrafiltration du lait avec un seuil de coupure moléculaire de 10 kDa (Ibáñez *et al.*, 2020; Moynihan *et al.*, 2016). Ce seuil de coupure sépare d'un côté la phase colloïdale et la matière grasse du lait et de l'autre côté l'eau du lait, le lactose et les minéraux solubles. Cette opération a pour

effet de concentrer le lait en protéine et en matière grasse tout en l'appauvrissant en lactose. Cependant, le caillé obtenu à partir de laits concentrés est difficile à travailler (Bush *et al.*, 1983). En effet, le caillé est plus visqueux car il s'égoutte moins facilement. Il est donc endommagé par le travail en cuve, devient plus humide et le fromage développe des défauts de goût (Bush *et al.*, 1983; Green *et al.*, 1981). Pour ces raisons, la fabrication de fromage type semi-hard ou pâte pressée non cuite à partir d'un lait standardisé en lactose nécessite une diafiltration, c'est-à-dire l'ajout d'eau au rétentat standardisé en lactose (Aimar & Daufin, 2004). Bien qu'efficace pour la fabrication de Mozzarella (Moynihan *et al.*, 2016) et de Gouda (Ibáñez *et al.*, 2020), les fromages fabriqués à partir de lait diafiltré présentent des teneurs en calcium associé aux caséines inférieures aux fromages délactosés. Cet impact est directement lié à l'ultrafiltration du lait et à l'ajout d'eau qui entraînent une diminution de la teneur en calcium colloïdal (Li & Corredig, 2014). Il est probable que l'ajout d'eau au rétentat crée une pression osmotique entraînant la solubilisation du calcium colloïdal. La déminéralisation de la matrice fromagère se traduit par une diminution de la rigidité du Gouda et une diminution de la température nécessaire pour le faire fondre (Ibáñez *et al.*, 2020).

Selon Ibáñez *et al.* (2020) la standardisation du lait en lactose par ultrafiltration permettrait de réduire la consommation d'eau par rapport à la gestion de sa teneur par le délactosage. Cependant, l'utilisation de l'ultrafiltration est une étape supplémentaire à la préparation du lait, augmentant ainsi le temps de préparation et le coût de production du fromage. Ces inconvénients pourraient expliquer pourquoi la standardisation du lactose par diafiltration est minoritaire dans les industries fromagères par rapport au délactosage.

2.4 Maturation du lait

En fabrication de fromage à pâte pressée non cuite, le lait est chauffé autour de 30 °C puis estensemencé avec des bactéries lactiques, le plus souvent mésophiles (se développant de manière optimale entre 25 °C et 40 °C). Ces bactéries lactiquesensemencées sont qualifiées de « starter » ou SLAB (starter lactic acid bacteria) par opposition aux bactéries lactiques nonensemencées (NSLAB pour « non starter lactic acid bacteria ») représentées majoritairement par le genre *Lactobacillus* (Fox *et al.*, 2017). Le rôle principal des bactéries SLAB est de consommer le lactose du lait, de produire de l'acide lactique et ainsi de faire baisser le pH du

fromage. Le lactose est un disaccharide composé de glucose et de galactose reliés par une liaison β 1,4 (Figure 4). Pour être fermentée par les SLAB, la molécule de lactose est internalisée dans la cellule et hydrolysée par une galactosidase. Le glucose est fermenté via la glycolyse et dans le cas des bactéries capables de consommer le galactose, il est fermenté par la voie Leloir ou la voie tagatose (Iskandar *et al.*, 2019).

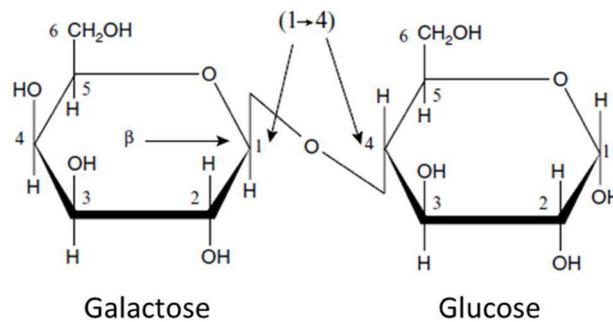


Figure 4 : Représentation cyclique d'une molécule de lactose (liaison β 1,4).

Certaines espèces, comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont largement utilisées pour leur capacité à consommer le lactose rapidement et donc à acidifier le fromage rapidement. La fermentation d'une molécule de lactose par les lactocoques entraîne la production de 4 molécules de lactates. D'autres bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* sont plutôt considérées comme aromatiques car elles sont capables de consommer le citrate du lait et de produire des molécules aromatiques comme le diacétyle et l'acétoïne. La fermentation d'une molécule de lactose par *Leuconostoc mesenteroides* produit 2 molécules de lactates, 2 molécules d'éthanol et 2 molécules de CO_2 , qui peut entraîner la formation de petites ouvertures dans le fromage.

La maturation est une étape nécessaire pour l'adaptation de ces bactéries dans l'environnement du lait. Au cours de cette étape, les bactéries produisent les enzymes qui leur permettent de consommer les éléments nutritifs du milieu, essentiellement le lactose. Lorsque les bactéries lactiquesensemencées ont été lyophilisées, l'étape de maturation doit être suffisamment longue pour leur permettre de se réhydrater.

2.5 Coagulation du lait

La coagulation est le résultat de la déstabilisation de la phase colloïdale du lait. En fabrication de fromage à pâte pressée, la phase colloïdale du lait est déstabilisée principalement par un coagulant enzymatique. Celui-ci a pour effet d'hydrolyser les caséines κ se trouvant à la surface des micelles et d'en libérer l'extrémité, le CMP. L'hydrolyse du CMP entraîne une déshydratation de la micelle ainsi qu'une diminution de sa charge. Lorsqu'environ 90 % des caséines κ sont hydrolysées, la répulsion électrostatique entre les micelles est très faible entraînant leur agrégation. Des interactions hydrophobes se forment alors au niveau des sites apolaires créés en surface par l'hydrolyse de la caséine κ (Snappe *et al.*, 2010). L'agrégation des micelles et le réarrangement des caséines forment alors un réseau protéique réticulé, le coagulum, qui renferme la phase aqueuse du lait et ses solutés. Le coagulant enzymatique peut être d'origine animale, microbienne ou végétale. Le coagulant le plus connu est la présure, extraite de la caillette du veau et contenant deux enzymes : la pepsine et la chymosine. Si dans un premier temps le rôle du coagulant est d'hydrolyser les caséines κ , une partie du coagulant est retrouvé dans le fromage et participe à l'affinage en hydrolysant d'autres types de caséines en fonction des affinités de l'enzyme. L'activité protéolytique de la chymosine étant moins élevée que celle de la pepsine au cours de l'affinage, il est courant d'utiliser la chymosine seule comme coagulant pour limiter la protéolyse liée au coagulant résiduel au cours de l'affinage. Lors de la coagulation, la diminution du pH consécutive à la consommation du lactose par les bactéries lactiques et à la production d'acide lactique participe à la fermeté du coagulum. La diminution du pH entraîne une diminution de l'ionisation des micelles et donc une diminution de la répulsion électrostatique entre elles. Un pH autour de 6 au moment de la coagulation permet d'obtenir une fermeté maximale du coagulum. En dessous du pH 6, les minéraux associés aux caséines, le calcium et le phosphate inorganiques, commencent à se solubiliser et cela entraîne une diminution de la fermeté du coagulum (Lucey *et al.*, 2003).

La matière grasse, en état d'émulsion dans le lait, s'agrège également sur les micelles sous l'effet de la diminution de la répulsion électrostatique et de la libération des sites hydrophobes.

La structure tridimensionnelle du coagulum forme différentes porosités contenant la phase aqueuse : les Grandes Porosités Extramicellaires (GPE) et les Petites Porosités Extramicellaires (PPE) (Figure 5).

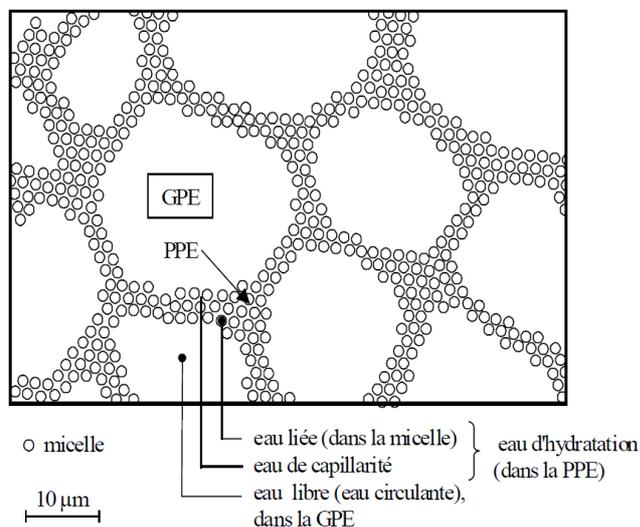


Figure 5 : Répartition de l'eau dans un gel présure (GPE = grande porosité extramicellaire, PPE = petite porosité extramicellaire) (Lablée, 1989 ; Tarodo de la Fuente *et al.*, 1999).

2.6 Le décaillage

Lorsque le coagulum est découpé (ou « décaillé »), les parois d'une grande partie des GPE sont rompues, libérant une grande quantité de lactosérum (Tarodo De La Fuente & Lablée, 1993). À ce stade, le coagulum est divisé en grains de caillé qui se retrouvent alors en suspension dans le lactosérum libéré que nous appellerons « Lactosérum Extra-Granulaire » (LEG) (Mietton *et al.*, 2004).

Par opposition, le lactosérum contenu à un instant t dans les grains de caillé est appelé « Lactosérum Intra-Granulaire » (LIG). Le terme « lactosérum » est employé lorsque aucune distinction n'est faite entre LIG et LEG.

2.7 Le travail du mélange caillé-lactosérum en cuve

Des échanges de phase aqueuse et de solutés ont lieu entre LIG et LEG, en traversant le réseau protéique. Ces échanges dépendent de la perméabilité du réseau protéique, qui varie en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, et de sa composition. Une augmentation de sa température entraîne une augmentation de sa perméabilité. À l'inverse, un pH plus élevé ou une concentration en protéines plus élevée resserre le réseau protéique et entraîne la diminution de sa porosité (Fagan *et al.*, 2017). La synérèse est un des principaux phénomènes responsables de ces échanges. Elle résulte de la réorganisation du réseau protéique du caillé après le décaillage, accélérée par l'acidification consécutive à la consommation du lactose et à la production d'acide lactique. Cette réorganisation induit une rétractation progressive des grains de caillé sur eux-mêmes et entraîne l'expulsion du LIG (Fagan *et al.*, 2017). La synérèse des grains de caillé est accélérée par le brassage de la cuve et est dépendante de plusieurs conditions physico-chimiques et de la composition du caillé.

L'augmentation de la température augmente la mobilité moléculaire et donc la vitesse de réorganisation des caséines (Fagan *et al.*, 2017). La diminution du pH favorise également la synérèse en accélérant la réorganisation du réseau protéique (Fagan *et al.*, 2017). La synérèse est contrôlée lors de la fabrication, entre le décaillage et le soutirage, avec l'ajustement de la température et de la vitesse du brassage, principalement pour contrôler l'égouttage du caillé et par conséquent l'humidité du fromage. Le temps de travail en cuve du mélange caillé-lactosérum ainsi que le brassage et le chauffage qui composent cette étape sont adaptés pour obtenir un égouttage précis du caillé et atteindre la teneur en extrait sec total (EST) désirée du fromage.

L'étape de travail en cuve du mélange caillé-lactosérum prend fin lorsque la cuve est soutirée et que le caillé est séparé du LEG. Cette séparation peut être réalisée simplement en versant le caillé dans les moules et en laissant s'écouler le lactosérum. Le soutirage peut également être réalisé avec un groupe de soutirage sous vide (GSV) dans lequel caillé et lactosérum se séparent par différence de densité.

2.8 Le délactosage

Le délactosage est réalisé au cours du travail en cuve du mélange caillé-lactosérum. L'objectif premier du délactosage est de diminuer la teneur en lactose de la phase aqueuse du caillé. Il a également pour objectif secondaire de contribuer à la gestion de la teneur en humidité du caillé qu'il affecte avec la température de l'eau de délactosage utilisée. En effet, le délactosage peut être réalisé avec de l'eau chaude par la dilution du mélange caillé-lactosérum avant le soutirage de la cuve, ou après le soutirage par le rinçage à l'eau froide du caillé égoutté.

2.8.1 La dilution du lactosérum

Dans la littérature, ce protocole de délactosage est communément appelé « whey dilution » (littéralement « dilution du lactosérum »). Il consiste à ajouter de l'eau chaude (35-60°C) dans la cuve de fabrication pour diluer la teneur en lactose du caillé, qui permet d'augmenter la vitesse de chauffage de la cuve et d'encourager la synérèse du caillé (Fox & Guinee, 2013). L'ajout d'eau de dilution est précédé dans la plupart des cas du retrait d'une partie du lactosérum : typiquement, la fabrication traditionnelle du Gouda implique le retrait de 40 % à

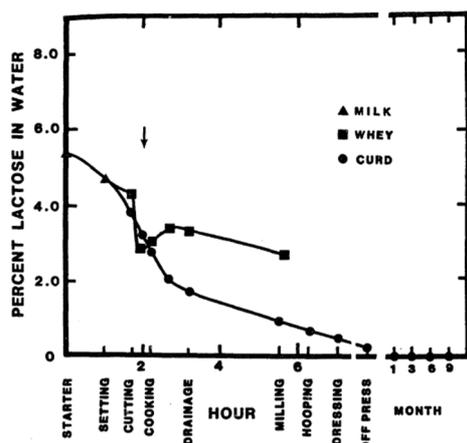


Figure 6 : Évolution de la teneur en lactose dans le lait, le lactosérum et la phase aqueuse du caillé lors de la fabrication de Cheddar (Huffman 1985) (↓ = ajout d'eau dans la cuve).

50 % du lactosérum de la cuve (pourcentage par rapport à la quantité de lait initiale) et l'addition de 30 % à 40 % d'eau (Johnson *et al.*, 1998; van den Berg & de Vries, 1975). Cependant, les volumes de lactosérum retiré et d'eau ajoutée sont très variables en fonction du procédé utilisé : certains processus impliquent un ajout d'eau sans retrait de lactosérum tandis que d'autres impliquent un retrait de lactosérum plus important que d'eau ajoutée. Par exemple, Eugster-Meier *et al.* (2018) présentent d'une part, un protocole de délactosage utilisé pour la fabrication de la Raclette Suisse pour

lequel 30 % d'eau sont ajoutés sans retrait de lactosérum, et d'autre part un protocole utilisé pour la fabrication d'Havarti (fromage danois à pâte pressée non cuite au lait de vache) pour lequel 20-25 % de lactosérum sont retirés et 10-20 % d'eau sont ajoutés. Ce retrait de lactosérum est réalisé pour plusieurs raisons. D'une part, il permet d'optimiser le volume de la cuve : en retirant du lactosérum, une partie du volume est libérée pour pouvoir ajouter de l'eau. D'autre part, le retrait de lactosérum diminue le volume de mélange caillé-lactosérum à diluer et donc le volume d'eau nécessaire pour atteindre une teneur en lactose cible.

La dilution n'affecte pas directement la phase aqueuse du caillé en cuve (LIG) car c'est le lactosérum dans lequel sont suspendus les grains de caillé (LEG) qui est dilué. En effet, Huffman (1985) a rapporté une diminution immédiate de la teneur en lactose du LEG suite au délactosage, tandis que la teneur en lactose du LIG diminue plus progressivement (Figure 6). Suite à la dilution, la teneur en lactose du LEG augmente, reflétant le transfert du lactose du LIG vers le LEG. Il serait possible d'augmenter l'efficacité du délactosage en le réalisant deux fois consécutivement, accélérant ainsi le transfert du lactose du LIG au LEG (Verschueren *et al.*, 2002). Selon ces auteurs, un délactosage en deux étapes (« two-stage curd washing ») permettrait d'économiser 10 à 20 % d'eau et 10 à 15 % du temps nécessaire.

2.8.2 Le rinçage du caillé

Lorsqu'il est réalisé après soutirage, le délactosage consiste à tremper le caillé égoutté ou à le rincer en le pulvérisant d'eau froide (< 18 °C) avant le moulage. Ce protocole est utilisé pour la fabrication de variétés fromagères appelées les « washed-curd varieties », telles que le Colby et le Monterey (fromages apparentés au Cheddar) fabriquées et consommées principalement dans les pays anglo-saxons. Ce protocole vise deux objectifs : 1) éliminer le lactose résiduel et 2) refroidir le caillé pour ralentir la synérèse et obtenir un fromage plus humide. L'obtention d'une teneur en humidité plus élevée permet de diminuer la teneur en protéines du fromage et ainsi de diminuer la rigidité de sa matrice. Pour rincer ou pour tremper le caillé égoutté, un volume d'eau correspondant à 25 % du volume initial de lait dans la cuve est utilisé et le mélange de caillé et d'eau de rinçage est brassé pendant 5-15 minutes avant salage puis moulage (Fox & Guinee, 2013). Le rinçage consiste à pulvériser l'eau sur le caillé égoutté et à le laisser s'évacuer directement tandis le trempage consiste à retenir l'eau et à prolonger le temps de contact avec le caillé.

En annexe 1, sont présentées les variétés fromagères concernées par le délactosage et les protocoles utilisés.

La dilution du lactosérum est le protocole de délactosage le plus répandu en Europe par rapport au rinçage du caillé, et utilisé dans la majorité des variétés fromagères nécessitant un délactosage. La thèse s'est donc focalisée sur ce protocole en particulier et le terme « délactosage » employé tout au long de ce document y fait référence exclusivement.

2.9 L'égouttage en moule et le démoulage

Après soutirage de la cuve, le caillé est égoutté en moule par pressage. À partir du moulage, où le caillé n'est plus en suspension dans le lactosérum, il n'y a plus d'échanges entre LIG et LEG. Au fur et à mesure que l'humidité est expulsée, la vitesse d'égouttage diminue et les solutés sont de moins en moins évacués. Ainsi, l'acide lactique produit par la fermentation se concentre dans le fromage à partir du pressage et la vitesse de baisse du pH augmente. De manière générale pour les fromages à pâte pressée non cuite, l'acidification se déroule entre le pressage et le démoulage (20 h après le moulage). Le terme de « post-acidification » est évoqué lorsque l'acidification se poursuit après le démoulage. Cette « post-acidification » est indésirable car une trop forte acidité aboutit à des défauts de goût et de texture.

La diminution du pH du fromage est directement liée à la production d'acide lactique dans le fromage. Cependant, le pH est modulé par le pouvoir tampon du caillé/fromage, qui reflète sa capacité à résister aux variations engendrées par la libération de molécules acides (acide lactique) ou basiques (ammoniaque lors de la protéolyse). Les ions acides ou basiques sont captés par les composants, solubles ou liés à la matrice protéique, qui les neutralisent et les empêchent de faire varier le pH. Les principaux composants tampons du caillé et du fromage (Tableau 3) sont les caséines, les protéines sériques, le phosphate inorganique, et les acides organiques (lactates, citrates...).

Le pouvoir tampon d'un milieu est mesuré avec la quantité d'acide ou de base nécessaire pour induire une variation de pH d'une unité donnée, selon la formule de Van Slyke (1922) :

$$\frac{dB}{dpH} = \frac{\text{Volume d'acide ou de base} \times \text{normalité de la solution}}{\text{Volume de l'échantillon} \times \text{changement de pH produit}}$$

L'indice de pouvoir tampon dB/dpH varie en fonction des pKa (ou pH de demi-dissociation) des différents groupements acido-basiques présents dans le milieu. L'indice est élevé dans les zones de pH correspondant au pKa des groupements acido-basiques des composants captant les ions acides ou basiques le plus efficacement.

Tableau 3 : Principaux composés tampon dans du caillé et leurs zones de pH tampon associées (Salaün, 2005).

Composés tampon	Zones de pH
Caséines micellaires et minéraux associés	3,5 (groupements carboxyles) – 4,5-5,5 (phosphates organiques)
Phosphate inorganique	5-7
Protéines sériques	3-4
Acides organiques	3-4,8 (citrate) – 3,9 (lactate)

2.9.1 Impact de la dilution du lactosérum sur l'égouttage et l'acidification

La capacité du délactosage à éviter la post-acidification a été démontrée par van den Berg & de Vries (1975). Dans leur étude, la dilution a induit un ralentissement de la diminution du pH avant le démoulage et donc un pH plus élevé du fromage que dans les fabrications non délactosées, où la diminution du pH s'est poursuivie après le démoulage. Ce ralentissement est attribuable à la limitation de la teneur en lactose, dont une partie a été éliminée par la dilution. Hou *et al.* (2012) ont démontré que la diminution des teneurs en lactose + acide lactique dans la phase aqueuse des fromages est proportionnelle à la quantité d'eau de

dilution ajoutée, dans le cadre d'un protocole où le volume d'eau ajouté est égal au volume de lactosérum retiré. Dans ce cadre, pour 100 kg de lait initial dans la cuve, chaque kilogramme d'eau de dilution réduit de 0,04 % la teneur en lactose + acide lactique dans la phase aqueuse du fromage. Ainsi, les auteurs ont obtenu 4,28 % (non dilué), 3,52 %, 3,32 %, et 2,95 % de teneur en lactose + acide lactique, en retirant 0 %, 16,1 %, 21,6 %, et 33 % de lactosérum, respectivement, et en ajoutant la même quantité d'eau. La diminution du lactose induit une diminution significative de la production d'acide lactique entre les différents niveaux de dilution et une augmentation du pH pendant l'affinage du fromage (Hou *et al.*, 2012; Jaros *et al.*, 1997).

Le pH est un facteur important pour l'équilibre des minéraux dans le fromage. Comme dans le lait, une partie des minéraux est soluble dans la phase aqueuse et l'autre partie est associée aux caséines. À partir de pH 5,2, le phosphate de calcium associé aux caséines est considéré comme totalement solubilisé ; les minéraux restant associés aux caséines sont le calcium et le phosphate organique des résidus phosphosérine des caséines (Gaucheron, 2005). Ce n'est qu'à partir de pH 3,5 que la totalité du calcium associé aux caséines est solubilisée (Gaucheron, 2005). Le réseau protéique n'étant plus une phase colloïdale d'un liquide, nous parlerons de calcium associé aux caséines ou calcium « insoluble » (Ca INSOL) par opposition au calcium soluble dans la phase aqueuse du fromage.

Lee *et al.* (2011) ont démontré que le pH du fromage au démoulage et son évolution au cours de l'affinage influence la teneur en Ca INSOL du fromage. Ainsi, en limitant la diminution du pH avec le délactosage, une diminution de la solubilisation du Ca INSOL est attendue. En effet, Salaün (2005) rapporte une diminution des teneurs en calcium (Ca) et phosphates inorganiques (Pi) dans la phase aqueuse du fromage au démoulage dans les fromages les plus délactosés. Cependant, van den Berg & de Vries, (1975) ont rapporté des pertes de Ca et de Pi plus importantes dans le lactosérum des fabrications délactosées que dans le lactosérum des fabrications non délactosées. La perte plus importante de minéraux dans le lactosérum suggère une solubilisation accrue du phosphate de calcium de la matrice du caillé au cours de la fabrication. Cela peut s'expliquer par la dilution des sels tampons de la phase aqueuse du caillé par le délactosage, qui aurait rendu la matrice plus vulnérable à l'acidification et aurait entraîné une plus grande solubilisation de ses minéraux (van den Berg & de Vries, 1975). En

effet, un impact du dé lactosage sur le pouvoir tampon a été décrit par Salaün (2005) qui a montré une corrélation entre la diminution du pouvoir tampon de la phase aqueuse du fromage au démoulage et le niveau de dilution. La diminution du pouvoir tampon est liée à une élimination accrue des composés tampons tels que les acides organiques, le Pi et les protéines solubles (Salaün, 2005). De plus, l'élimination accrue du lactose par le dé lactosage a diminué la teneur en acide lactique de la phase aqueuse qui tamponne l'acidité sous forme de lactates. Bien que le pouvoir tampon ait été réduit, l'acidification l'a également été et l'effet net du dé lactosage a été de diminuer la solubilisation du Ca INSOL mesuré au démoulage (Salaün, 2005).

La capacité du dé lactosage à limiter l'acidification est confirmée par la littérature. De plus, la dilution de la phase aqueuse du caillé affecte le pouvoir tampon, qui diminue lorsque la dilution augmente. En revanche, l'impact du dé lactosage sur la minéralisation du fromage reste à explorer car le dé lactosage semble à la fois entraîner une perte plus importante de minéraux pendant la fabrication mais aussi limiter la solubilisation du Ca INSOL. L'impact du dé lactosage sur d'autres acides organiques que l'acide lactique comme le citrate n'est pas évoqué dans la littérature, ainsi que l'impact sur les protéines solubles.

2.9.2 Impact du rinçage du caillé sur l'égouttage et l'acidification

Des impacts différents ont été rapportés entre les deux modes de rinçage du caillé : le rinçage par pulvérisation de l'eau et le trempage. Au démoulage, le lactose résiduel dans le caillé rincé est plus élevé (0,11 %) que dans le caillé trempé (0,02 %) (Lee *et al.*, 2011). Il en résulte une quantité supérieure d'acide lactique dans le fromage à deux semaines d'affinage. Cela s'explique par une meilleure diffusion du lactose depuis le LIG vers l'eau de rinçage lorsque le caillé est trempé car le temps de contact entre le caillé et l'eau est plus long.

L'objectif principal du rinçage de caillé est de réduire la teneur en lactose résiduel du caillé, mais il permet également de diminuer la rigidité de la matrice. Pour ce faire, le rinçage du caillé se fait avec de l'eau froide pour obtenir une teneur en humidité élevée du fromage et ainsi limiter la concentration en caséines par unité de volume de la matrice (Fox *et al.*, 2017). Cependant, une déminéralisation de la matrice est également attendue par l'utilisation de ce protocole (Johnson *et al.*, 1998). En effet, lorsque le caillé est rincé, son pH est à 5,7 et une

partie du phosphate de calcium a probablement été solubilisée (Lee *et al.*, 2011). Le rinçage du caillé à ce moment a donc permis d'éliminer les minéraux solubilisés et de diminuer la minéralisation totale du fromage. Toutefois, des différences de teneur en Ca INSOL au démoulage ont été observées entre les fromages à caillé rincé (21,7 mg de Ca INSOL/g de protéine) et les fromages à caillé trempé (22,7 mg de Ca INSOL/g de protéine) (Lee *et al.*, 2011). Cette différence est le reflet de niveaux d'acidification différents avant le démoulage, résultant probablement des différences de teneurs en lactose résiduel après rinçage du caillé.

2.10 L'affinage

Après le saumurage, les fromages à pâte pressée non cuite sont affinés entre 1,5 et 3 mois à température comprise entre 10 °C et 14 °C (Goudédranche *et al.*, 2001; Klantschitsch *et al.*, 2000). Dans le cas des fromages à pâte pressée non cuite à croûtes lavées ou emmorgées tels que la Raclette, la surface estensemencée avec des micro-organismes d'affinage, dont le rôle est de former la croûte et de désacidifier le fromage en dégradant les lactates. Cette microflore est composée de mycètes telles que *Debaromyces hansenii*, *Geotricum candidum* et *Kluyveromyces lactis* et de bactéries telles que *Brachybacterium* sp., *Microbacterium gubbeenense* et *Agrococcus casei* (Fox *et al.*, 2017). C'est lors de l'affinage que se développent les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage, au travers de nombreux phénomènes physico-chimiques, microbiologiques et enzymatiques.

2.10.1 Le pH

L'affinage peut être vu comme un processus à deux étapes, dont la longueur est variable en fonction des variétés fromagères et des conditions d'affinage (Lucey *et al.*, 2003). Dans les premiers jours ou les premières semaines, les principaux changements dans la matrice sont plutôt chimiques, avec la réorganisation du réseau protéique suite à la solubilisation du Ca INSOL. La deuxième étape, jusqu'à la fin de l'affinage implique davantage de changements biochimiques et enzymatiques, notamment avec la protéolyse. Le pH est un paramètre central dans ce processus. Au démoulage, le pH des fromages à pâte pressée est « bas » (entre pH 5,0 et 5,2) car presque tout le lactose a été dégradé en acide lactique par les bactéries lactiques. C'est à ce moment que la solubilisation du Ca INSOL est la plus rapide. Une augmentation du pH est attendue au cours de l'affinage causée par plusieurs facteurs. La microflore d'affinage consomme les lactates, conduisant à une désacidification du fromage (McSweeney, 2004).

Avec la désacidification du fromage, le pH augmente légèrement, la solubilisation du Ca INSOL diminue et la protéolyse s'accélère près de la surface du fromage. Avec la protéolyse et la dégradation des acides aminés, des molécules d'ammoniaque sont libérées, ce qui accélère l'augmentation du pH. Le pouvoir tampon du fromage module l'évolution du pH : un pouvoir tampon fort ralentit l'augmentation du pH tandis qu'un pouvoir tampon faible permet une augmentation plus rapide du pH du fromage.

Le pH du fromage étant fortement lié à la quantité d'acide lactique produite, la gestion du lactose par le délactosage a un impact sur l'évolution du pH pendant l'affinage. Plus le niveau de dilution est élevé, plus le pH augmente pendant l'affinage (Hou *et al.*, 2012). En effet, la quantité d'acide lactique produite ayant été limitée, la désacidification est probablement plus rapide. Une quantité moindre d'acide lactique dans le fromage diminue également le pouvoir tampon de sa phase aqueuse, favorisant ainsi l'augmentation du pH pendant l'affinage.

2.10.2 L'évolution de la teneur en Ca INSOL

Le Ca INSOL est la part des minéraux du fromage jouant un rôle structural dans la matrice et est donc déterminant pour les propriétés fonctionnelles et sensorielles. La teneur en Ca INSOL peut être déterminée par la différence entre la teneur en Ca total dans le fromage et sa teneur dans la phase aqueuse. Pour ce faire, il est nécessaire d'extraire la phase aqueuse du caillé ou du fromage. En variétés de fromage à pâte pressée non cuite, cette opération est réalisable au démoulage par ultracentrifugation de l'échantillon de fromage mais devient compliquée à mettre en œuvre en cours d'affinage, où la quantité de phase aqueuse extraite diminue. Pour surmonter cette difficulté, des extractions de phase aqueuse du fromage au cours de l'affinage ont été réalisées en pressant des échantillons moulus dans du sable avec une presse hydraulique (Salvat-Brunaud *et al.*, 1995). Toutefois, cette méthode est contraignante car une quantité importante de fromage est nécessaire (1,8 kg) et la quantité de phase aqueuse obtenue est faible (autour de 160 g de phase aqueuse) et variable. De plus, cette méthode nécessite une presse suffisamment puissante (jusqu'à 42 bars) et un dispositif spécifique pour récupérer le liquide extrait de l'échantillon. Une autre méthode a été développée, consistant à estimer la teneur en Ca INSOL par rapport au pouvoir tampon du fromage (Hassan *et al.*, 2004). Une forte acidification du fromage crée un pic de pouvoir tampon du fromage dans la zone de pH autour de 4,8, traduisant la solubilisation de Ca INSOL. La teneur en Ca INSOL peut être déterminée en

rapportant l'aire de ce pic obtenue avec le fromage à l'aire obtenue avec le lait initial, dont la teneur en Ca INSOL peut être déterminée plus facilement. Les résultats obtenus par cette méthode n'ont pas présenté de différences significatives par rapport aux résultats obtenus via l'extraction de la phase aqueuse par presse hydraulique (Hassan *et al.*, 2004).

À cause des contraintes liées à la mesure de la teneur en Ca INSOL du fromage, l'impact des paramètres de fabrication sur l'évolution de la teneur en Ca INSOL pendant l'affinage a été étudié sur peu de variétés fromagères. Des observations ont été rapportées concernant des fromages à pâte pressée non cuite à caillé broyé (Cheddar et Colby) (Hassan *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2010), ainsi que des fromages à pâte pressée cuite (Emmental) (Lamichhane *et al.*, 2019). Ces fromages ont un pH compris entre 5,0 et 5,2 au démoulage et voient leur Ca INSOL se solubiliser à hauteur de 13 % environ au cours du premier mois d'affinage (Hassan *et al.*, 2004; Lamichhane *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2010).

L'impact des deux modes de rinçage du caillé (rinçage et trempage) sur l'évolution du Ca INSOL de fromage Colby a été étudié (Lee *et al.*, 2011). Au démoulage, la teneur en Ca INSOL des Colby à caillé trempé était plus élevée que celle des Colby à caillé rincé : cela s'explique par une élimination plus efficace du lactose par le trempage, limitant ainsi l'acidification et la solubilisation du Ca INSOL. Cependant, l'évolution des teneurs en Ca INSOL pendant l'affinage des deux modes de dé lactosage n'était pas représentative des différences observées au démoulage. En effet, d'une part la teneur en Ca INSOL des fromages à caillé rincé diminue fortement au cours du premier mois puis se stabilise jusqu'à la fin de l'affinage (3 mois). D'autre part, la teneur en Ca INSOL des fromages à caillé trempé diminue progressivement tout au long de l'affinage. Au bout de 3 mois, les teneurs en Ca INSOL sont similaires dans les deux modalités : les fromages à caillé trempé ont vu leur Ca INSOL se solubiliser davantage (16 %) que les fromages à caillé rincé (13 %) (Lee *et al.*, 2011). Deux facteurs peuvent expliquer ces dynamiques : 1) La faible augmentation du pH pendant l'affinage (5,1 au démoulage à 5,3 en fin d'affinage) a permis une solubilisation continue du Ca INSOL ; 2) La solubilisation du Ca INSOL semble être modulée par un « pseudo-équilibre » entre le calcium soluble et le Ca INSOL (Lucey *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2006). En effet, dans l'étude de Lee *et al.* (2011), l'atteinte de teneurs en Ca INSOL avec deux vitesses de solubilisation différentes suggère qu'un seuil a été atteint au-delà duquel le Ca INSOL ne se solubilise plus. Un phénomène similaire,

également attribué au « pseudo-équilibre » avait été observé précédemment avec différentes gestions de la phase aqueuse du Colby ayant abouti à des teneurs en Ca INSOL différentes au démoulage (Lee *et al.*, 2010).

L'utilisation du rinçage de caillé semble favoriser des différences de pseudo-équilibre car la différence de cinétiques de solubilisation du Ca INSOL entre fromages à caillé rincé et caillé trempé n'a pas été observée dans le cas de fromages non dé lactosés présentant des différences de teneurs en Ca INSOL au démoulage (Lee *et al.*, 2005). En effet, au cours de l'affinage du Cheddar, dont la fabrication classique n'implique ni dé lactosage ni rinçage du caillé, différentes teneurs en Ca INSOL obtenues au démoulage évoluent avec la même cinétique au cours de l'affinage. Les fromages contenant initialement 55 % et 70 % de Ca INSOL par rapport au Ca total atteignent des teneurs de 45 % et 60 % de Ca INSOL par rapport au Ca total, respectivement (Lee *et al.*, 2005). Dans l'étude de Lee *et al.* (2011), il est donc probable que le trempage du caillé, diluant le LIG plus efficacement qu'un rinçage simple, ait augmenté l'écart entre les teneurs en Ca soluble et Ca INSOL et ainsi favorisé la solubilisation du Ca INSOL.

2.10.3 Métabolisme des lactates

Les lactates sont produits par la fermentation du lactose par les bactéries lactiquesensemencées. Deux formes isomériques existent en fonction de l'espèce bactérienne qui l'a produit : par exemple *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produit des lactates-L et *Leuconostoc mesenteroides* produit des lactates-D. Ces lactates sont dégradés par la microflore d'affinage à la surface du fromage et cela crée un gradient de pH avec un pH élevé en surface et un pH faible au centre du fromage (McSweeney, 2004). Les lactates vont alors diffuser depuis le centre du fromage vers la surface en suivant le gradient de pH et ainsi être disponibles à la dégradation par la microflore d'affinage.

Les lactates étant le produit de la fermentation du lactose, le dé lactosage entraîne une diminution de la quantité de lactates produits (Jaros *et al.*, 1997). Une relation de proportionnalité existe entre le niveau de dilution du mélange caillé-lactosérum et la quantité de lactates dans le fromage pendant l'affinage (Hou *et al.*, 2012).

2.10.4 La protéolyse

La protéolyse contribue au développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage de deux façons : par la diminution des interactions entre caséines induites par leur

hydrolyse et par la libération de composés aromatiques. Deux stades de protéolyse sont identifiés : la protéolyse primaire et la protéolyse secondaire. La protéolyse primaire est l'hydrolyse des caséines intactes du fromage en grands peptides. Elle a peu d'impact direct sur la flaveur du fromage mais affecte sa texture et ses propriétés fonctionnelles à cause de la dégradation de la matrice. La protéolyse secondaire est la dégradation des grands peptides en petits peptides et en acides aminés. À l'inverse de la protéolyse primaire, la protéolyse secondaire est susceptible d'affecter la flaveur du fromage avec la production de petits peptides et la libération d'acides aminés précurseurs de composés aromatiques, mais a moins d'impacts sur les propriétés fonctionnelles et de texture.

2.10.4.1 La protéolyse primaire

Plusieurs protéases peuvent être impliquées dans la dégradation des caséines du fromage, en fonction des paramètres technologiques de la fabrication (Tableau 4). Ces enzymes ont une activité qui dépend principalement de l' a_w du fromage et de son pH (McSweeney, 2004).

Le coagulant résiduel joue un rôle non négligeable dans la protéolyse mais son activité dépend des paramètres de fabrication. Entre 0 % et 30 % du coagulant ajouté au lait sont retrouvés dans le caillé, en fonction de la nature de la protéase, de la température de la cuve, du pH au moment du soutirage et de la teneur en humidité du caillé (Ardö *et al.*, 2017). En fabrication de Cheddar, il a été démontré que plus le pH au soutirage est bas, plus la quantité de chymosine bovine retenue dans le caillé est importante (Creamer *et al.*, 1985). La pepsine et la chymosine ont une activité protéolytique optimale à pH acide (Tableau 4) suggérant que leur activité est susceptible de diminuer avec l'augmentation du pH au cours de l'affinage. La pepsine hydrolyse des sites spécifiques sur les caséines $\alpha S1$, $\alpha S2$ et β . La chymosine hydrolyse en priorité les caséines $\alpha S1$, particulièrement au niveau de la liaison Phe₂₃-Phe₂₄, et dans une moindre mesure les caséines β . L'activité de la chymosine sur les caséines β génère la production de petits peptides hydrophobes responsables de l'apparition d'amertume. En augmentant le pH du fromage au démoulage, le délactosage est susceptible de diminuer l'activité des protéases acides telles que la pepsine et la chymosine. Une diminution de la protéolyse et notamment de la dégradation des caséines $\alpha S1$ a été rapportée par Jaros *et al.* (1997) au cours de l'affinage d'Emmental, liée à l'augmentation du niveau de délactosage.

Deux enzymes endogènes du lait sont susceptibles de participer à l'activité protéolytique du fromage au cours de l'affinage : la plasmine et la cathepsine D. Dans le lait frais, la plasmine est présente sous la forme inactive de plasminogène, qui est régulé par des molécules activatrices de la plasmine et des inhibiteurs d'activateurs de plasminogène (McSweeney, 2004). L'activité de la plasmine est optimale à pH 7,5, ce qui suggère que son activité augmente au cours de l'affinage. La plasmine est la protéase endogène la plus importante et elle hydrolyse spécifiquement les caséines β et α S1 (Tableau 4). Une augmentation significative de l'activité de la plasmine par le dé lactosage a été rapportée lors de la fabrication de fromage de type pâte pressée cuite (Vélez *et al.*, 2016). Cette activité accrue est attribuable à un pH plus élevé lié à la limitation de l'acidification par le dé lactosage. Cependant, au dé moulage une grande partie du plasminogène des fromages dé lactosés était déjà activée, suggérant une activation pendant la fabrication. Il est donc possible que le dé lactosage ait entraîné l'activation du plasminogène par l'élimination des inhibiteurs d'activateurs de plasminogène que l'on trouve à l'état soluble dans la phase aqueuse (McSweeney, 2004). Une autre enzyme endogène du lait est la cathepsine D, protéase acide dont la spécificité est similaire à la chymosine (Tableau 4) ; son activité est donc masquée par cette dernière. Cependant, la chymosine est peu résistante à la chaleur et le chauffage du caillé entre 47 °C et 53 °C ralentit fortement son activité (Sheehan *et al.*, 2007). La cathepsine D est donc susceptible de jouer un rôle protéolytique non négligeable dans les variétés de fromage à pâte pressée cuite.

L'hydrolyse des caséines est généralement liée au coagulant résiduel et aux protéases endogènes du lait. Néanmoins, les bactéries lactiques peuvent sécréter des protéases hydrolysant spécifiquement les caséines du fromage (Reid & Coolbear, 1999). Les lactocépines sont les principales protéases des bactéries lactiques, notamment les lactocoques et lactobacilles. Ces protéases sont localisées sur leur paroi et agissent de manière optimale à pH 5,5-6,5 (Tableau 4), suggérant que leur activité augmente au cours de l'affinage. Les lactocépines sont classées en deux groupes principaux, les P_I et P_{III}, produites par des espèces bactériennes différentes et avec des spécificités différentes. Les P_I dégradent rapidement les caséines β et lentement les caséines α S1 tandis que les P_{III} dégradent les caséines β , α S1 et κ (Ardö *et al.*, 2017).

Tableau 4 : Principales protéases impliquées dans la protéolyse du fromage pendant l'affinage.

Origine	Protéase	pH optimal	Substrat	Référence
Endogène	Plasmine	7,5	Caséines β et α S2	Farkye & Fox, 1990
	Cathepsine D	4	Caséines α S1 et β	Hurley <i>et al.</i> , 2000
Coagulant résiduel	Chymosine bovine	3-4	Caséines α S1 et β	Sousa <i>et al.</i> , 2001
	Pepsine bovine	2-3	Caséines α S1, β et α S2	Yegin & Dekker, 2013
Bactérienne	Lactocépine P _I	5,5-6,5	Caséines β , α S1	Ardö <i>et al.</i> , 2017
	Lactocépine P _{III}	5,5-6,5	Caséines β , α S1 et κ	Ardö <i>et al.</i> , 2017

2.10.4.2 La protéolyse secondaire

Après l'hydrolyse des caséines en grands peptides, ces grands peptides sont hydrolysés en peptides plus petits, puis en acides aminés par la microflore du fromage. Les bactéries starter (par exemple les lactocoques), les non-starter (par exemple les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs) ainsi que les levures (*Kluyveromyces lactis*, *Debaromyces hansenii*) et les moisissures d'affinage (*Geotricum candidum*) sont des acteurs importants de la peptidolyse. Dans les fromages à pâte pressée non cuite, les lactobacilles les plus représentés sont des mésophiles, avec les espèces *Lactobacillus casei*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* et *curvatus* (Beresford *et al.*, 2001). Ces micro-organismes internalisent les peptides pour les dégrader avec leurs peptidases intracellulaires. La peptidolyse est toutefois plus importante après la lyse cellulaire, qui libère les peptidases dans le fromage (Ardö *et al.*, 2017).

La libération de petits peptides et d'acides aminés est importante pour le développement de la flaveur du fromage. Par exemple, l'intensité de l'amertume du fromage est directement corrélée à la quantité de petits peptides hydrophobes et aux acides aminés vecteurs d'amertume (les principaux sont l'isoleucine, la phenylalanine, la leucine, la methionine, la proline et la valine) (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). D'autres acides aminés ont été corrélés à des saveurs en particulier. Par exemple, les peptides γ -G sont corrélés à la saveur umami dans le Gouda (Toelstede *et al.*, 2009). En revanche dans le Comté, les peptides γ -G ont plutôt été corrélés aux saveurs salé, aigre et métallique (Roudot-Algaron & Kerhoas, 1994). Des acides aminés ont été associés à la saveur sucrée (proline, lysine, alanine, glycine, sérine et thréonine), l'amertume (histidine, asparagine et acide glutamique), umami (leucine, tyrosine, asparagine et acide glutamique) (Mcsweeney, 1997).

Des impacts du délactosage sur le profil d'acides aminés de Cheddar ont été rapportés (Hou *et al.*, 2014). Dans cette étude, la phenylalanine, le glutamate, la lysine et la leucine étaient présents en concentrations inférieures dans les fromages les plus délactosés. Ce résultat est cohérent avec la constatation de la diminution de l'intensité globale du goût des fromages les plus délactosés.

2.10.5 Métabolisme des citrates

Les citrates sont naturellement présents dans le lait à approximativement 1,7 g/L (McSweeney, 2004) et sous deux états : soluble (90 %) ou lié aux caséines de la phase colloïdale (10 %) (Gaucheron, 2005). En solution, les citrates peuvent être métabolisés par les bactéries citrate (+) comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Le catabolisme des citrates génère la production de CO₂, qui peut être responsable de la formation d'ouvertures dans le fromage, de composés aromatiques comme l'acide acétique, le diacétyle et l'acétoïne (McSweeney, 2004).

Les citrates étant majoritairement solubles, leur métabolisme pourrait être affecté par le délactosage mais cet impact n'a pas été rapporté dans la littérature.

2.10.6 La matière grasse et la lipolyse

La lipolyse, ou la dégradation enzymatique de la matière grasse, participe au développement des propriétés sensorielles du fromage, notamment par la libération de composés aromatiques. La lipolyse peut être réalisée par deux types d'enzymes : les lipases et les estérases (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). Ces deux enzymes catalysent la même réaction mais sont actives dans des environnements différents. Elles hydrolysent les mono- di- et tri-acylglycerides au niveau de la fonction ester et libèrent d'un côté un acide gras libre et de l'autre côté un alcool (glycerol). Les estérases agissent sur les substrats solubles, à savoir les acides gras à chaînes courtes (constitués de 8 carbones ou moins) tandis que les lipases agissent sur les acides gras à longues chaînes, plus hydrophobes (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). Ces enzymes ont des origines diverses. Le lait contient des lipases endogènes, les lipases lipoprotéiques (LPL), qui sont associées aux caséines et sont inactivées en majorité par la pasteurisation. Des enzymes lipolytiques peuvent être sécrétées par les bactéries du fromage, notamment les *Lactococcus* et *Lactobacillus*, et les levures d'affinage comme *Geotrichum candidum* (Fox *et al.*, 2017). Des estérases peuvent être apportées avec la présure (Kilcawley

& O'Sullivan, 2018). Cependant, la matière grasse du lait est protégée de la lipolyse par la membrane lipoprotéique des globules gras. Si la membrane est endommagée par des contraintes mécaniques survenues pendant la fabrication, les triglycérides des globules gras sont exposés à une lipolyse importante et cela peut conduire au développement de goûts indésirables (McSweeney, 2004). Par ailleurs, la matière grasse joue un rôle important dans le développement des propriétés sensorielles et rhéologiques du fromage en contribuant à la texture et en agissant comme solvant d'autres composés aromatiques issus de la protéolyse, du métabolisme du lactose et des acides organiques.

L'absence d'impact du délactosage sur la matière grasse a été rapportée dans plusieurs études (Hou *et al.*, 2012; Jaros *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2011; Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2004).

3 Les propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles du fromage reflètent le comportement de sa matrice en réponse à des contraintes qui peuvent être mécaniques (compression, découpe, étirement...) ou thermiques (chauffage). Ces contraintes peuvent apparaître au cours de la transformation fromagère : par exemple le filage dans la fabrication de la Mozzarella ou le développement des ouvertures pendant l'affinage, qui dépendent de la déformabilité de la matrice en réponse à un étirement ou à la pression du gaz. Ces contraintes peuvent être dues à des transformations du fromage ultérieures à sa fabrication telles que le tranchage et le râpage dont l'efficacité dépend de propriétés de la matrice telles que sa rigidité et son adhésivité. Le fromage en tant qu'ingrédient est susceptible d'être préparé ou consommé sous forme fondue par exemple sur une pizza ou dans un plat comme la Raclette. Dans ce contexte, les propriétés fonctionnelles du fromage sont par exemple sa température de fonte, sa fluidité, sa capacité à faire des fils, à gratiner et sa capacité à rester homogène ou bien à exsuder sa matière grasse. Les propriétés fonctionnelles du fromage sont liées à certaines propriétés sensorielles, comme la texture et l'aspect visuel. De nombreuses méthodes ont été développées pour mesurer les propriétés fonctionnelles du fromage. Les méthodes évoquées dans cette synthèse bibliographique et utilisées pour cette thèse sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Techniques d'analyse des propriétés fonctionnelles évoquées dans la littérature.

Grandeur mesurée	Propriété correspondante	Technique d'analyse
Module de déformabilité	Rigidité	CUVC
Contrainte à la fracture	Résistance (« Strength »)	CUVC
Énergie à la fracture	Robustesse (« Toughness »)	CUVC
Déformation à la contrainte	Déformabilité	CUVC
G' (module de conservation)	Propriété élastique	SAOR
G'' (module de perte)	Propriété visqueuse	SAOR
Loss tangent (LT) (ratio G''/G')	Fluidité	SAOR
LTmax	Fluidité maximale	SAOR
Température à LTmax	Température pour laquelle la fluidité est maximale	SAOR
Étalement	Capacité de fonte	Test de Schreiber
Force d'extrusion à chaud	Élasticité à chaud	Mesure au texturomètre INSA-ITFF
Exsudation d'huile	Tendance de l'échantillon à déphaser	Mesure à chaud au butyromètre
Longueur de fil	Capacité à filer	Test "à la fourchette" ou au filomètre
Colorimétrie	Gratiant	Mesure au chromamètre

CUVC : Compression uniaxiale à vitesse constante

SAOR : small amplitude oscillatory rheometry

Les propriétés fonctionnelles sont directement liées à la nature des molécules composant la matrice, à leur conformation et aux interactions entre elles (Lorient *et al.*, 1991). Dans cette partie, les impacts connus de la composition et du pH du fromage sur les propriétés fonctionnelles sont présentés.

3.1 Développement des propriétés fonctionnelles

3.1.1 Les protéines et la protéolyse

Le réseau de caséines peut être vu comme l'armature de la matrice du fromage, structurée par le phosphate de calcium, les liaisons hydrogènes entre les caséines, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques (Gagnaire *et al.*, 2002; Lucey *et al.*, 2003). Une augmentation de la teneur en caséines de la matrice se traduit par une augmentation des ramifications à l'intérieur du réseau caséique et donc d'une augmentation de ces interactions entre les caséines, qui augmente la résistance de la matrice. Pour cette raison, la teneur en caséines du fromage est un des paramètres contribuant le plus aux propriétés rhéologiques

de la matrice. Par exemple, les fromages à teneur en matière grasse réduite (dérivés du Cheddar) présentent une densité de caséines plus importante que les fromages à teneur en matière grasse non modifiée, ce qui leur confère une fermeté accrue (Chen *et al.*, 1979; Fox *et al.*, 2017). Pour diminuer la fermeté de ces fromages, une des stratégies employées consiste à rincer le caillé égoutté à l'eau froide pour diminuer la synérèse afin d'obtenir des fromages plus humides (Johnson *et al.*, 1998). De cette manière, la concentration en caséines par unité de volume est diminuée et la matrice du fromage à faible teneur en matière grasse retrouve de la souplesse (Johnson & Chen, 1995).

De manière générale, la dégradation des caséines se traduit par une diminution du nombre de ramifications du réseau protéique et par conséquent par l'affaiblissement de la matrice. Dans le Gouda, la rigidité diminue avec l'augmentation de la protéolyse primaire (azote soluble dans l'eau) de manière presque linéaire (Visser, 1991). Dans l'Emmental, la concentration en caséines α S1 est corrélée positivement avec la contrainte à la fracture, c'est-à-dire avec la résistance de la matrice (Gagnaire *et al.*, 2002; Lamichhane *et al.*, 2019). Bien que cela soit moins décrit, les caséines β peuvent également contribuer à la résistance de la matrice dans le Cheddar que leur dégradation fait diminuer (Bogenrief & Olson, 1995). Les caséines β sont plus impliquées dans la déformabilité de la matrice (Lamichhane *et al.*, 2019).

Les caséines β semblent également plus impliquées que les caséines α S1 dans les propriétés de fonte de la matrice, car leur dégradation a été fortement corrélée avec la température à LT_{max} d'un fromage type Cheddar (Bogenrief & Olson, 1995). Les peptides libérés par la dégradation des caséines sont susceptibles de jouer un rôle dans les propriétés rhéologiques de la matrice, par leur nature hydrophile ou hydrophobe. Parmi ces peptides, la fraction f1-24 de la caséine α S1 est fortement hydrophobe et est libérée par l'action de la chymosine. Ce peptide interagit avec les régions hydrophobes des autres caséines α S1 et des caséines β et contribue à créer un réseau protéique continu (Creamer & Olson, 1982; Lawrence *et al.*, 1987). Plusieurs études suggèrent que la libération de grands peptides hydrophobes (plus de 20 acides aminés) serait susceptible d'augmenter les propriétés élastiques de la matrice en augmentant le nombre d'interactions hydrophobes (Lacou *et al.*, 2015; Richoux *et al.*, 2009). Les interactions hydrophobes entre caséines sont sensibles à la température et se renforcent avec une élévation de celle-ci. Cela entraîne une rétractation des particules de caséines sur

elles-mêmes, diminuant les contacts entre elles et par conséquent la force globale du réseau (Lucey *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'action de la chymosine entraîne la libération de la fraction hydrophile f24-199 de la caséine α S1 qui contribue à la diminution de la fermeté de la matrice par son interaction avec l'eau (Lacou *et al.*, 2016).

L'ampleur de la protéolyse secondaire est un facteur participant au brunissement du fromage à la cuisson, ou « gratinant ». Ce type de brunissement, dit « non enzymatique » résulte de la réaction de Maillard, qui est une réaction entre des sucres réducteurs (lactose, galactose, glucose) et des acides aminés. Une augmentation du brunissement non enzymatique lié à l'augmentation du niveau de protéolyse a été rapportée (Oberg *et al.*, 1991).

3.1.2 Le pH

Dans le fromage comme dans le lait, le pH affecte à la fois la charge des caséines, dont le point isoélectrique se situe environ à pH 4,6, et le calcium qui y est associé. Au pH initial du lait (~ pH 6,7), la charge négative des caséines induit une répulsion électrostatique qui les éloigne entre elles (Snappe *et al.*, 2010). Au fur et à mesure que le pH se rapproche du point isoélectrique, la répulsion électrostatique tend à diminuer et les caséines tendent à se rapprocher, augmentant la cohésion entre les caséines. Cependant la diminution du pH induit également la solubilisation du Ca INSOL qui libère les résidus phosphosérine des caséines qui se repoussent alors de manière électrostatique (Lucey, 2002). D'une part, l'abaissement du pH tend à diminuer la répulsion électrostatique entre les caséines et d'autre part, la répulsion électrostatique globale est augmentée par la libération des résidus phosphosérine par la solubilisation du Ca INSOL. Lorsque le pH est bas (à partir de 4,9), une grande partie du Ca INSOL est solubilisée et une grande partie des résidus phosphosérine des caséines a déjà été libérée ; la répulsion électrostatique globale recommence donc à diminuer sous l'effet de la diminution du pH. À partir de pH 4,9, les interactions entre caséines se renforcent et induisent une matrice ferme avec une faible capacité à fondre (Lucey *et al.*, 2003). L'impact direct du pH sur les interactions entre les caséines est étroitement lié à la minéralisation de la matrice. En effet dans l'Emmental affiné, il a été démontré que l'augmentation du pH entre pH 5,7 et 6,1 en maintenant une teneur en Ca INSOL stable, entraîne une solubilisation croissante des caséines β et dans une moindre mesure des caséines α -S1 (Gagnaire *et al.*, 2002). Le pH affecte également l'hydratation des caséines, qui est maximale autour de pH 5,3 et minimale

autour de pH 4,6 (Fox et al., 2017). Ainsi, les caséines hydratées sont davantage polarisées et se repoussent entre elles par répulsion électrostatique, entraînant une diminution de la rigidité de la matrice et une augmentation de sa fluidité lors de la fonte (Lucey *et al.*, 2005). L'impact direct du pH sur les propriétés fonctionnelles du fromage est à prendre en considération mais il est masqué la plupart du temps par ses impacts sur la protéolyse et sur la solubilisation du Ca INSOL.

3.1.3 La teneur en Ca INSOL

Au cours de la fabrication de fromages à pâte pressée, le pH est descendu dans la plupart des cas autour de pH 5,2 le lendemain de la fabrication, valeur autour de laquelle une majorité du phosphate inorganique est solubilisée. Le Ca INSOL est donc à ce moment-là le minéral dont la teneur peut encore varier, en affectant potentiellement le développement des propriétés fonctionnelles. Il est généralement admis qu'une augmentation de la teneur en Ca INSOL de la matrice du fromage induit une augmentation de sa fermeté et de la force nécessaire pour la fracturer (Fox *et al.*, 2017). En effet, le Ca INSOL forme des interactions entre les caséines qui renforcent la matrice (Gagnaire *et al.*, 2002). Par ailleurs, une étude récente réalisée sur l'Emmental a montré une corrélation entre la teneur en Ca INSOL et la déformation à la facture, traduisant la déformabilité de la matrice (Lamichhane *et al.*, 2019). La teneur en Ca INSOL joue un rôle important dans les propriétés de fonte de la matrice. Une diminution de la teneur en Ca INSOL de Cheddar induit une fluidité accrue de la matrice à chaud (LT_{max}) ainsi qu'une diminution de la température nécessaire à la fonte (température à LT_{max}) (Lucey *et al.*, 2005).

3.1.4 La teneur en matière grasse

Le rôle de la matière grasse dans les propriétés fonctionnelles du fromage dépend en grande partie de sa température. À basse température (< 5°C), la matière grasse est solide et les globules gras limitent la déformation de la matrice dans laquelle ils sont enchâssés. Le module de déformabilité, traduisant la rigidité de la matrice, est alors élevé, ainsi que la force nécessaire pour la fracturer. Au fur et à mesure que la température augmente, le comportement de la matière grasse devient de plus en plus visqueux, et sa fluidité est maximale autour de 40 °C. La matrice devient alors moins rigide et nécessite moins de force pour être fracturée (Fox *et al.*, 2017). Toutefois, la matière grasse ne joue qu'un rôle mineur dans le ramollissement de la matrice. Lucey *et al.* (2003) ont démontré que la LT du Cheddar,

traduisant sa fluidité, n'augmente de manière importante qu'à partir de 40 °C. La matière grasse étant déjà entièrement liquéfiée à cette température, ce résultat montre que la fonte de la matrice du fromage est davantage liée à l'évolution des interactions entre les caséines qu'à la teneur en matière grasse. Néanmoins, une diminution de la teneur en matière grasse du fromage s'accompagne d'une augmentation de la teneur en caséines, qui entraîne une augmentation de la rigidité de la matrice et de la contrainte à la fracture (Fox *et al.*, 2017).

3.1.5 La teneur en humidité

L'humidité est un composant majeur du fromage (45 % à 50 % dans les fromages à pâte pressée non cuite) qui affecte les propriétés fonctionnelles de plusieurs façons.

Une teneur en humidité plus élevée s'accompagne d'une teneur en protéines plus faible, induisant une matrice moins rigide (Walstra & van Vliet, 1982). De plus, une teneur en humidité élevée s'accompagne d'une augmentation de l' a_w et par conséquent d'activités enzymatiques plus importantes. Par ces impacts, une teneur plus élevée en humidité dans le Gouda induit une diminution du module de déformabilité (rigidité), de la contrainte à la fracture (résistance de la matrice) et une augmentation de la déformation à la fracture (déformabilité) (Visser, 1991).

3.1.6 La teneur en sel

L'influence du sel sur les propriétés fonctionnelles du fromage est visible à l'œil nu proche de la croûte des fromages salés par saumurage. Cette zone est dure, friable, sèche tandis que la matrice devient souple, élastique et plus hydratée vers le centre du fromage. Ces observations s'expliquent par une diminution de la teneur en humidité de la matrice : chaque 1 % de NaCl dans l'humidité du fromage réduit sa teneur en humidité de 1,5-2 % (Fox *et al.*, 2017). Cependant, le NaCl entraîne également une hydratation des caséines et par conséquent un gonflement du réseau : la présence de NaCl augmente les interactions ioniques dans la matrice, donc la solubilité des caséines (Pastorino *et al.*, 2003). Entre 0 % et 6 % de teneur en NaCl dans l'humidité, le réseau caséique s'hydrate et gonfle. Au-delà de 6 %, le réseau se déshydrate et se contracte (Fox *et al.*, 2017). Ce phénomène affecte la déformation à la fracture (mesurée dans le Gouda) : entre 0 % et 5 % de NaCl, la matrice devient plus déformable et à partir de 5%, la déformabilité diminue drastiquement (Visser, 1991). L'augmentation de l'hydratation du réseau engendre dans un premier temps un

comportement de la matrice plus visqueux et moins élastique et au-delà de 5-6 % de NaCl, un comportement plus élastique (Guinee & Fox, 2017). Cette viscosité est due à une polarisation des caséines en lien avec leur hydratation, qui augmente la répulsion électrostatique entre elles et donc la déformabilité de la matrice. Le module de déformabilité et la contrainte à la fracture présentent moins de variations : ils augmentent avec la teneur en NaCl (Visser, 1991).

L'absorption de l'humidité par le NaCl affecte les activités enzymatiques et par conséquent la texture. En effet, l'augmentation de la teneur en NaCl entraîne une diminution proportionnelle de l'activité de l'eau (Delacroix-Buchet & Trossat, 1991). La baisse de l'activité de l'eau a globalement entraîné une diminution des activités enzymatiques du fromage et une diminution de la dégradation des caséines α S1 et β (Delacroix-Buchet & Trossat, 1991). Il en a résulté une diminution de la contrainte et de la déformation à la fracture.

L'augmentation de l'hydratation de la matrice par le salage augmente les propriétés de fonte du fromage grâce à une meilleure capacité à retenir l'eau pendant le chauffage. Des études ont rapporté que l'augmentation de la concentration en NaCl jusqu'à ~3 % entraîne une augmentation de la fluidité de la matrice lors de la fonte (Guinee & Fox, 2017). Ces études ont également montré une diminution de la fluidité de la matrice à partir de ~6 %.

3.2 Impacts du délactosage sur les propriétés fonctionnelles

Dans la littérature, l'impact du niveau de dilution du mélange caillé-lactosérum sur les propriétés fonctionnelles a été mis en lien principalement avec le niveau de protéolyse, qui est également affecté par le délactosage. Une augmentation du niveau de délactosage dans la fabrication d'Emmental a entraîné une augmentation de la contrainte et de la déformation à la fracture de la matrice à 16 semaines d'affinage (Jaros *et al.*, 1997). Les auteurs ont déterminé que la déformation à la fracture augmente de manière linéaire de 0,15 unité/10 % d'eau ajouté dans la cuve pour le délactosage. L'augmentation de la résistance de la matrice et de sa déformabilité est liée à une diminution du niveau de protéolyse en lien avec l'augmentation du niveau de dilution. La diminution de la dégradation de la caséine α S1 avec le niveau de dilution a été observée tandis que la dégradation de la caséine β n'a pas été affectée. Il est donc probable que le délactosage ait affecté une protéase acide, comme la cathepsine D (la chymosine ayant été vraisemblablement inactivée par le chauffage en cuve lors de la fabrication de l'Emmental) dont l'activité aurait diminué avec l'augmentation du pH

du fromage. Ce résultat est une nouvelle preuve de l'importance du rôle structural de cette caséine dans la matrice fromagère. Néanmoins, la teneur en Ca INSOL n'a pas été mesurée dans l'étude de Jaros *et al.* (1997) et cette information est manquante pour déterminer avec exactitude par quels mécanismes le dé lactosage a affecté les propriétés fonctionnelles du fromage.

L'impact du rinçage de caillé sur les propriétés fonctionnelles du fromage, *via* son impact sur la teneur en Ca INSOL a été décrit sur le fromage Colby. Au cours du premier mois d'affinage, les fromages dont le caillé a été trempé ont présenté une teneur en Ca INSOL plus élevée qui se traduit par une valeur de G' plus élevée que les fromages dont le caillé a été rincé. La matrice des fromages à caillé trempé est plus ferme car elle contient plus de Ca INSOL qui réduit la répulsion électrostatique entre les caséines. La teneur plus élevée en Ca INSOL a également affecté les propriétés de fonte de la matrice : les fromages à caillé trempé ont présenté une fluidité à chaud (LTmax) moins élevée que les fromages à caillé rincé (Lee *et al.*, 2011). Avec la diminution de l'écart de teneur en Ca INSOL au cours de l'affinage, les écarts de propriétés fonctionnelles (G' et LTmax) ont également diminué et en fin d'affinage, les fromages au caillé trempé et rincé présentaient des propriétés similaires.

4 Les propriétés sensorielles

Les propriétés sensorielles du fromage sont décrites principalement par des termes liés à la flaveur, à la texture et à l'aspect visuel (Kilcawley & O'Sullivan, 2018).

La flaveur du fromage se développe par trois mécanismes principaux : le métabolisme des sucres, la protéolyse et la lipolyse. Les sucres sont oxydés en pyruvate par les bactéries lactiques, qui peut être transformé par la suite en molécules aromatiques comme les lactates, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétaldéhyde et l'éthanol. Lors de la protéolyse, les petits peptides et acides aminés libérés sont vecteurs de nombreuses saveurs et arômes différents (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). Sans lipolyse, la matière grasse est naturellement vectrice de goûts car des molécules aromatiques hydrophobes peuvent y être solubilisées (Thierry *et al.*, 2017). La lipolyse participe au développement de la flaveur du fromage par la libération de moyens ou de petits acides gras libres dont le profil est très dépendant de la microflore du fromage et donc de sa variété (Thierry *et al.*, 2017). Dans certaines variétés fromagères comme les pâtes

molles de type Camembert ou les Bleus, la lipolyse est essentielle pour le développement du goût caractéristique de la variété. En revanche, dans certaines variétés comme le Gouda, le Cheddar et l'Emmental, une lipolyse limitée est attendue car créatrice de goûts indésirables.

De manière générale, le délactosage diminue l'intensité du goût du fromage (Hou *et al.*, 2014; Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2004). Dans le cas du Cheddar, les descripteurs associés aux fromages délactosés (« fruity », « buttery », « nutty », « sweet ») reflètent une diminution du caractère du fromage par rapport aux descripteurs des fromages non délactosés (« rancid », « farmyard », « vinegar », « acidic »). Dans ce cas, la diminution du goût semble être due majoritairement à une diminution des produits du métabolisme des sucres. Par ailleurs, différents profils d'acides aminés libres ont été rapportés entre Cheddar délactosés et Cheddar non délactosés (Hou *et al.*, 2014). Des concentrations plus faibles en phénylalanine, glutamate, lysine et leucine, contribuant aux saveurs amer, acide et umami ont été observées dans les fromages non délactosés (Hou *et al.*, 2014).

Le délactosage conditionne les propriétés fonctionnelles du fromage, il est donc très probable que sa texture appréciée par l'analyse sensorielle soit également affectée. En effet, l'augmentation de la contrainte et de la déformation à la fracture de l'Emmental liée à l'augmentation du niveau de délactosage a influencé l'acceptabilité de sa texture par le consommateur (Jaros *et al.*, 1997). Les auteurs ont rapporté que l'augmentation de la fermeté de la matrice est corrélée avec la diminution de l'acceptabilité. Ils ont également rapporté que la valeur de déformation à la fracture doit se trouver entre 1,15 et 1,30 pour que l'acceptabilité de l'Emmental par le consommateur soit optimale.

Les ouvertures du fromage, également appelés « yeux », sont un attribut visuel important qui caractérise des variétés fromagères de type Emmental (grandes ouvertures), Gouda (petites ouvertures) et Colby (petites ouvertures). L'augmentation de la déformabilité de la matrice avec le délactosage favorise le développement des ouvertures, dans l'Emmental (Jaros *et al.*, 1997; Moatsou *et al.*, 2004; Sheehan *et al.*, 2008). En présence d'une matrice déformable, l'accumulation de gaz produit par la fermentation bactérienne entraîne la formation de bulles. Le gaz est produit par la fermentation propionique, réalisée par les bactéries propioniques. Ces bactéries consomment l'acide lactique libéré par les bactéries lactiques suite à la fermentation du lactose et libèrent du CO₂ ainsi que d'autres molécules (acide propionique,

acétate, succinate). Cette activité est favorisée par un affinage en cave chaude (> 20 °C) et un pH proche de la neutralité. En augmentant le pH du fromage, le délactosage favorise ainsi l'ouverture du fromage : dans l'Emmental, le nombre et la taille des yeux a augmenté avec le niveau de dilution (Jaros *et al.*, 1997). Dans certaines variétés comme le Gouda et le Colby, des petites ouvertures sont attendues (Martley & Crow, 1996). Elles se développent suite à la dégradation du citrate libérant du CO₂ par certaines espèces de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* et *Leuconosoc mesenteroides*).

5 Conclusion sur les impacts du délactosage sur les caractéristiques des fromages au démoulage et affinés

L'impact du délactosage sur la teneur en lactose, l'acidification et le pH au démoulage est bien connu : la concentration en lactose + acide lactique dans le fromage diminue proportionnellement au niveau de délactosage (Hou *et al.*, 2012). Au démoulage, cela aboutit à un pH plus élevé et à une solubilisation moindre des minéraux. En revanche, l'impact du délactosage sur les autres solutés (protéines sériques, minéraux solubles, acides organiques) est peu connu. Le délactosage serait même susceptible d'entraîner une perte accrue des

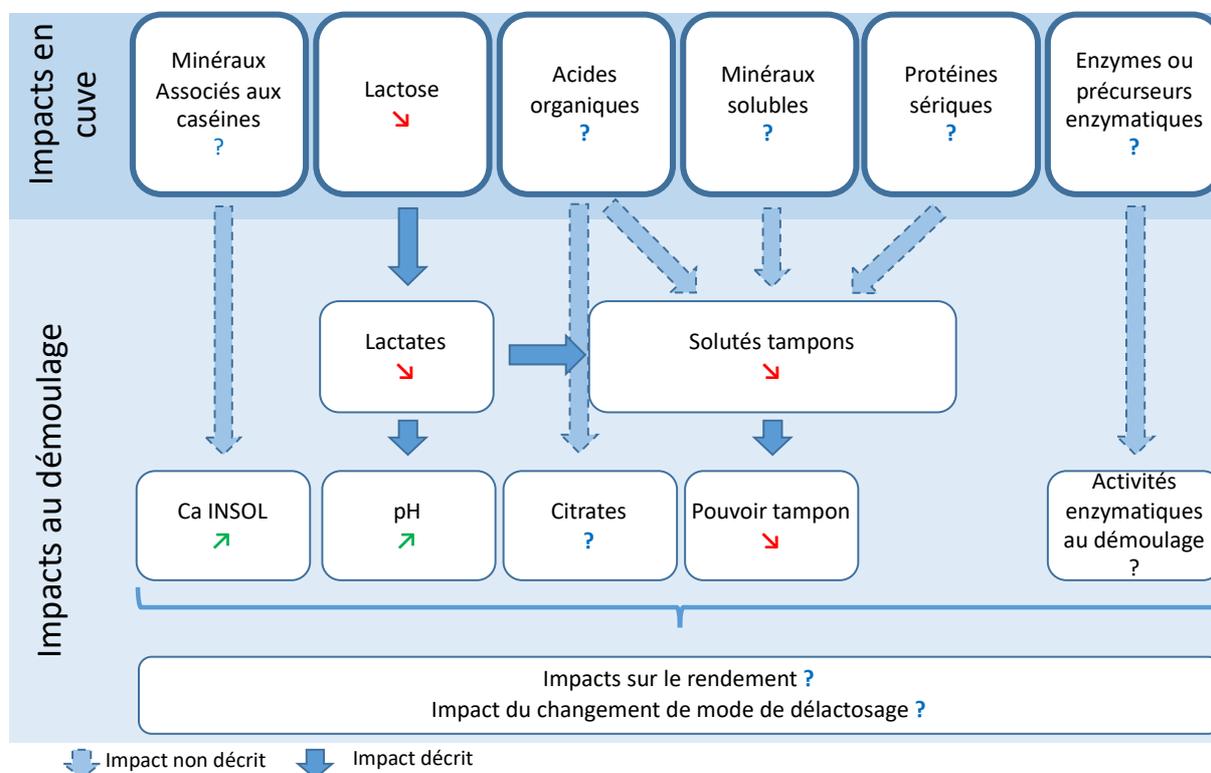


Figure 7 : Impacts en cuve du délactosage sur les propriétés du fromage au démoulage.

minéraux du caillé pendant la fabrication (van den Berg & de Vries, 1975). Parmi les solutés affectés par la dilution, des enzymes ou précurseurs d'enzymes participant à la protéolyse pourraient être éliminés et ainsi diminuer l'activité protéolytique dans le fromage (Vélez *et al.*, 2016). La plupart de ces composés participent au pouvoir tampon de la phase aqueuse, qui serait affecté au démoulage par leur élimination (Salaün, 2005). Le pouvoir tampon jouant un rôle important dans le déroulement de l'affinage, il est important de déterminer comment le délactosage l'affecte. Les impacts du délactosage en cuve et au démoulage sont résumés dans la Figure 7. L'impact du délactosage sur la composition de la phase aqueuse du caillé en cuve est donc aujourd'hui peu décrit et nécessite une investigation. De plus, les quantités de lactosérum retiré et d'eau ajoutée sont très variables d'une pratique de délactosage à l'autre mais ni les conséquences sur le fromage, ni l'intérêt économique n'est évoqué dans la littérature.

L'impact du délactosage sur le déroulement de l'affinage du fromage reste encore à explorer sur certains points. Son impact sur les activités enzymatiques a pu être étudié dans le cadre de fromages à pâte pressée cuite (Jaros *et al.*, 1997; Vélez *et al.*, 2016) mais ces variétés s'éloignent du cadre des variétés à pâte pressée non cuite étudiées dans cette thèse. De plus, ces résultats montrent d'une part, une augmentation des activités protéolytiques (Vélez *et al.*, 2016) et d'autre part, une diminution (Jaros *et al.*, 1997), toute deux liées au délactosage. En outre, les mécanismes par lesquels le délactosage affecte les activités enzymatiques ne sont pas déterminés. La modification du pH joue très probablement un rôle dans ces modifications, mais l'élimination de précurseurs enzymatiques avec la dilution est également pressentie (Vélez *et al.*, 2016). L'impact de la gestion de la phase aqueuse sur l'évolution de la teneur en Ca INSOL a été décrit, mais seulement dans le cadre du rinçage de caillé. Des différences de cinétiques de solubilisation du Ca INSOL ont été observées pendant l'affinage, conduisant à des teneurs en Ca INSOL similaires à 3 mois d'affinage. Ces différences pourraient être dues à des concentrations différentes en solutés de la phase aqueuse, modifiées par l'intensité du rinçage. La question se pose de savoir si le délactosage par dilution du mélange caillé-lactosérum affecte également la cinétique de solubilisation du Ca INSOL. Les impacts décrits dans la littérature du délactosage sur le déroulement de l'affinage sont résumés dans la Figure 8. La compréhension des impacts du délactosage sur les propriétés fonctionnelles et de texture du fromage nécessite de déterminer ses impacts sur le Ca INSOL et la protéolyse, qui

sont des paramètres structuraux majeurs de la matrice. La compréhension de l'impact du délactosage sur la protéolyse et sur la teneur en citrate apporterait également des explications sur le développement de la flaveur du fromage.

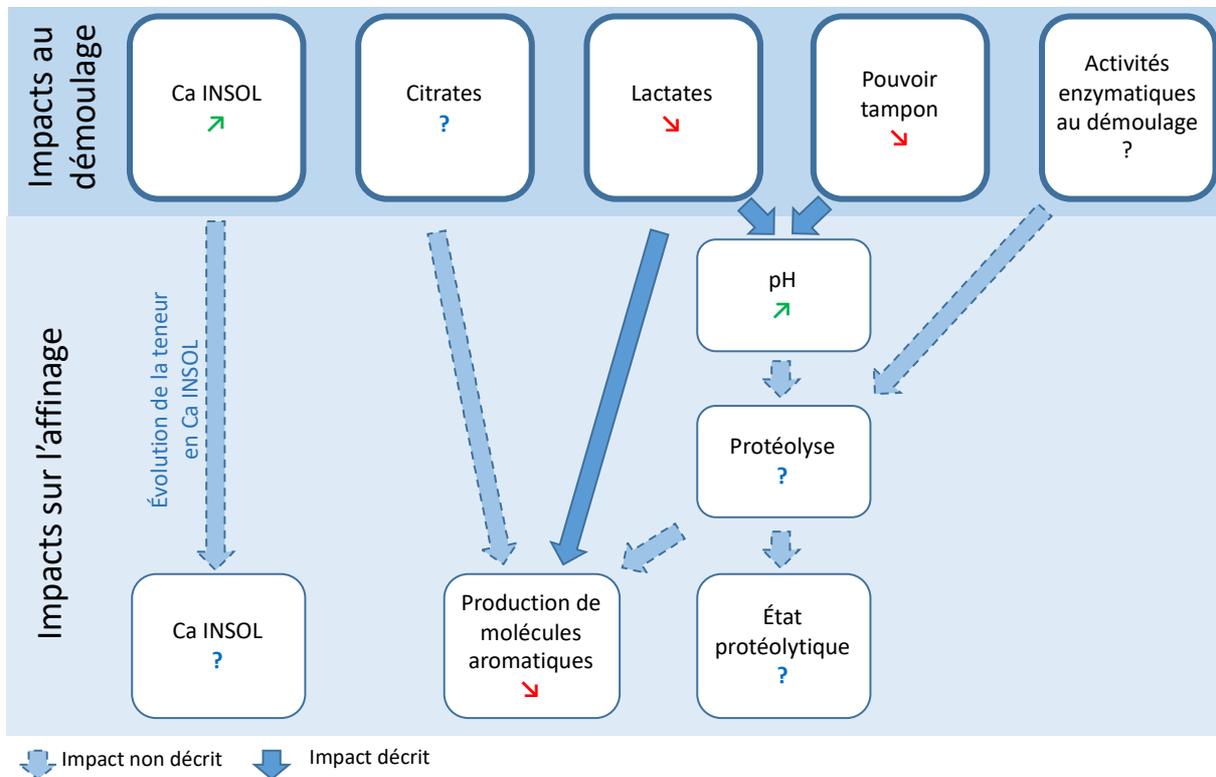


Figure 8: Impacts en cuve du délactosage sur le déroulement de l'affinage.

Les propriétés fonctionnelles et de texture dépendent en grande partie de l'état protéolytique de la matrice et de sa teneur en Ca INSOL. Cependant, l'impact du délactosage sur la protéolyse reste encore à explorer aujourd'hui ; un impact positif ou négatif sur la protéolyse entraînerait soit une dégradation et un affaiblissement de la matrice, soit une limitation de cet affaiblissement (Jaros *et al.*, 1997). De la même manière, une limitation de la solubilisation du Ca INSOL entraînerait un renforcement structural de la matrice tandis qu'une solubilisation suite à la dilution de la phase aqueuse entraînerait son affaiblissement en fin d'affinage (Lee *et al.*, 2011). Les impacts potentiels du délactosage décrits dans la littérature sur les propriétés fonctionnelles du fromage sont résumés dans la Figure 9.

L'étude de l'impact du délactosage sur les propriétés fonctionnelles des fromages à pâte pressée non cuite nécessite d'identifier les enzymes affectées par la dilution et la manière dont elles sont affectées. Sont-elles affectées par la modification du pH du fromage comme

dans l'étude de Jaros *et al.* (1997) ? Est-ce qu'une augmentation du pH du fromage par le délactosage entraîne une diminution de l'activité des protéases acides (chymosine, cathepsine D) ou au contraire une augmentation de l'activité des protéases alcalines (plasmine) ? Est-ce que les activités enzymatiques sont affectées par la dilution de la phase aqueuse qui est susceptible d'activer le plasminogène en éliminant ses inhibiteurs d'activateur (Vélez *et al.*, 2016) ? La connaissance des enzymes affectées par le délactosage permettrait de comprendre si le délactosage favorise ou limite la protéolyse du fromage. Cette information permettrait également de savoir quelles caséines sont dégradées par la protéolyse et par conséquent comment les propriétés fonctionnelles de la matrice sont affectées.

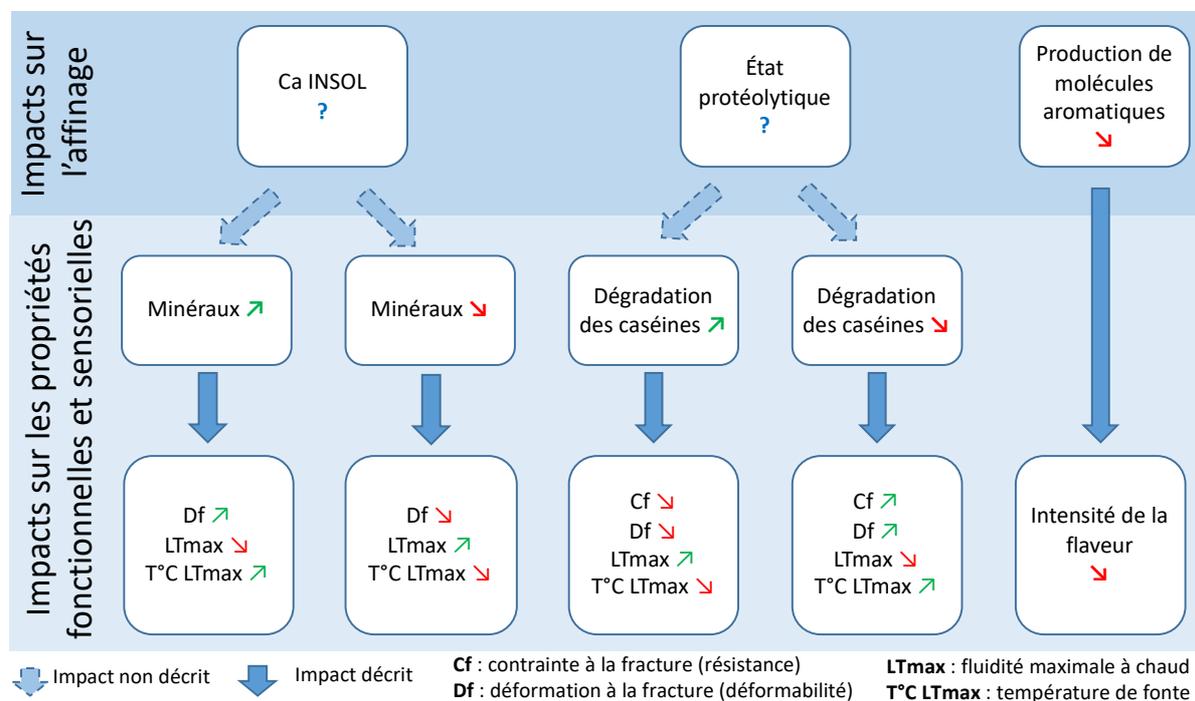


Figure 9 : Impacts potentiels du délactosage sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage.

Des impacts sur la protéolyse et le Ca INSOL entraînent des modifications de la microstructure du fromage qui se traduisent par des différences de propriétés fonctionnelles (Lamichhane *et al.*, 2019). L'étude des impacts du délactosage sur la microstructure du fromage, par microscopie confocale ou électronique pourrait apporter des éléments d'explications sur le développement des propriétés fonctionnelles et de texture du fromage.

L'impact du délactosage sur certaines propriétés rhéologiques a été rapporté dans la littérature (propriétés de fracture, analyse dynamique par oscillation à faible amplitude), mais il est difficile, avec ces résultats, d'anticiper le comportement de la matrice fromagère lors de

l'utilisation du fromage par le consommateur. Par exemple, un fromage de type Raclette sera la plupart du temps consommé fondu : est-ce que le délactosage favorise une fonte rapide ? La création de fils lors de l'étirement de la matrice ? Le gratinement du fromage ? Comment le délactosage affecte la texture à chaud du fromage qui sera perçue par le consommateur lors de l'étalement sur un plat ou lors de la mastication ? La connaissance des impacts du délactosage sur ces propriétés permettrait d'orienter ce dernier pour permettre le développement de qualités du fromage en lien avec la demande du consommateur.

6 Objectifs scientifiques et stratégie

L'objectif de cette thèse est d'apporter des connaissances sur les mécanismes induits par le délactosage contribuant aux propriétés fonctionnelles et sensorielles de fromages à pâte pressée non cuite. Des éléments de réponse ont été apportés suite à l'étude bibliographique. Néanmoins, certaines questions énoncées ci-dessous restaient à approfondir et ont conduit aux travaux de cette thèse :

Une partie de la réponse a été apportée à l'issue de la phase 1, qui a permis de dresser un bilan des connaissances concernant les impacts du délactosage pendant la fabrication du fromage, sur le déroulement de l'affinage et sur le développement de ses propriétés fonctionnelles et sensorielles. Toutefois, plusieurs lacunes de connaissances ont été identifiées et ont permis de formuler les questions suivantes :

- **Quels sont les impacts du délactosage sur la composition du caillé au cours de la fabrication et leurs conséquences sur les caractéristiques du fromage au démoulage ?** Il est important de répondre à cette question sachant que les caractéristiques initiales du fromage (début d'affinage) conditionnent les caractéristiques finales des fromages (à pâte pressée non cuite).
- **Quels sont les impacts du délactosage sur le déroulement de l'affinage ?**
- **Quels sont les impacts du délactosage sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné et comment peut-on les expliquer ?**

Notre stratégie pour répondre à ces questions a consisté à faire varier deux paramètres de délactosage au cours d'une série de fabrications de fromages à pâte pressée non cuite et

d'étudier les effets de ces variations. Les paramètres étudiés sont : le « Niveau », qui exprime la concentration en lactose résiduel total dans le mélange caillé-lactosérum avant soutirage de la cuve et le « Mode » qui exprime la quantité de lactosérum retiré par rapport à la quantité d'eau ajoutée. Trois niveaux ont été étudiés : les niveaux 41 g/kg et 32 g/kg atteints en délactosant et un niveau « non délactosé » dont la teneur en lactose du lait n'a pas été modifiée (approximativement 50 g/kg). Les niveaux 41 g/kg et 32 g/kg ont été atteints en délactosant selon deux modes : la quantité de lactosérum retirée est supérieure à la quantité d'eau ajoutée (LS>E) et la quantité de lactosérum retirée est égale à la quantité d'eau ajoutée (LS=E).

- Niveau : **Non délactosé** (abrégé : « **non dél.** »), **41 g/kg, 32 g/kg**
- Mode : **LS>E** (quantité de lactosérum retirée supérieure à la quantité d'eau ajoutée), **LS=E** (quantité de lactosérum ajoutée égale à la quantité d'eau ajoutée)

Les niveaux Non dél. et 32 g/kg sont des niveaux extrêmes tandis que 41 g/kg est un niveau intermédiaire : Non dél. est une absence de gestion de la phase aqueuse tandis que 32 g/kg est une gestion poussée, au-delà de laquelle il est difficile de retirer du lactosérum. Les modes LS>E et LS=E ont été choisis car ce sont les modes les plus utilisés en industrie.

Pour améliorer le transfert des résultats de la recherche vers l'industrie, ces paramètres ont été étudiés à l'échelle de fabrications pilotes, c'est-à-dire avec des cuves de 310 L.

La teneur en humidité du fromage est un paramètre pouvant être affecté par le délactosage et pouvant biaiser l'interprétation des résultats, notamment sur le déroulement de l'affinage. Bien que la composition en solutés de la phase aqueuse du fromage ait été gérée avec le délactosage, la quantité totale de ces solutés dans le fromage dépend également de la quantité de phase aqueuse qui les véhicule. De plus, la teneur en humidité est un paramètre important dans le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné. Son impact sur les activités enzymatiques pourrait en effet masquer celui du délactosage. Pour ces raisons, les fromages de toutes les modalités ont été fabriqués de manière à obtenir une teneur en MS (humidité) similaire au démoulage, entre 51 et 52 %. Pour ce faire, le temps de travail en cuve a été ajusté.

Ce plan expérimental a été mis en œuvre dans la phase 3

La perspective d'analyser séparément le caillé et le LEG des échantillons du mélange caillé-lactosérum prélevés en cuve soulève la problématique de l'échantillonnage et de la séparation de ces phases. En effet, le mélange caillé-lactosérum au cours de l'égouttage en cuve est hétérogène et trois phases peuvent être identifiées : le réseau protéique du caillé, la phase aqueuse du caillé (LIG) et le lactosérum externe au caillé (LEG). La composition en solutés entre le LIG et le LEG étant susceptible d'être différente (Huffman, 1985), une analyse précise de la composition du caillé nécessitait de séparer le caillé et son LIG du LEG. Cette séparation constituait un verrou à lever car la synérèse du caillé est dynamique et entraîne une hétérogénéité persistante de l'échantillon. Ainsi, dans la perspective d'analyser la composition du caillé pendant la fabrication une question s'est posée :

Comment prélever le caillé en cuve et le stabiliser afin de préserver sa composition du moment du prélèvement et permettre ainsi une analyse reproductible ?

Nous avons tenté de répondre à cette question par une série d'expériences organisées en trois volets :

Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ? Dans la littérature, la séparation du caillé et du lactosérum se fait par tamisage (Hou *et al.*, 2012; Huffman, 1985; O'Sullivan *et al.*, 2002) mais les conditions de tamisage, telles que le maillage du tamis, la taille des échantillons et le temps de tamisage sont peu décrites. Le temps de tamisage, en particulier est un paramètre important car c'est de lui que dépend la séparation du caillé et du LEG. Un temps de tamisage trop faible peut conduire à retenir trop de LEG potentiellement dilué tandis qu'un temps de tamisage trop important peut conduire à une perte trop importante de LIG et ainsi sous-estimer la part de solutés dans l'échantillon de caillé. L'objectif de ce premier volet est donc de déterminer un temps de tamisage permettant l'évacuation d'un maximum de LEG en limitant l'évacuation du LIG.

Deux approches ont été utilisées afin de caractériser ces deux phases aqueuses : l'étude du débit d'écoulement du lactosérum pendant le tamisage et l'étude de l'évolution de la teneur en lactose du lactosérum pendant le tamisage. Le débit est susceptible de caractériser la nature du lactosérum car il est soit périphérique au caillé tamisé (débit potentiellement rapide), soit retenu par le caillé (débit potentiellement ralenti). L'évolution de la teneur en

lactose du lactosérum pendant le tamisage est susceptible de caractériser la nature du lactosérum lorsque le mélange caillé-lactosérum a été dilué. À ce moment-là, le LEG est susceptible d'être davantage dilué que le LIG. Nous avons tenté de vérifier expérimentalement ces hypothèses dans ce volet. Au cours de ces expériences, le choix du volume de mélange caillé-lactosérum tamisé s'étant révélé important, l'impact de ce paramètre a également été étudié.

Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner le caillé tamisé ? Après séparation du caillé et du lactosérum, le caillé tamisé est instable car la synérèse est toujours dynamique et le LIG continue de s'exsuder, rendant l'échantillon hétérogène. Or, l'analyse du caillé nécessite une matrice homogène afin que les différentes analyses soient faites sur des prises d'essais similaires et représentatives de l'échantillon initial.

Deux méthodes de sous-échantillonnage ont été étudiées. La première méthode est la division du caillé intact en sous-échantillons immédiatement après tamisage : un prototype de « répartiteur » de caillé a été construit dans cette perspective. La deuxième méthode est la création de sous-échantillons après le mixage du caillé tamisé. Cette méthode a fait l'objet d'une mise au point présentée dans ce volet. L'impact du couple vitesse/durée de mixage a été étudié pour maximiser l'homogénéisation de l'échantillon ainsi que la température de mixage. Enfin, les deux méthodes de sous-échantillonnage ont été comparées pour choisir la plus efficace.

Volet 3 : Comment prélever le mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement ? Le protocole de séparation du caillé et du LEG par tamisage permet de déterminer la proportion de caillé (et son LIG) et de LEG dans un échantillon. Ainsi, il a été observé pendant ces expériences que les proportions de caillé et de LEG sont variables d'un échantillon à l'autre, variations probablement dues à la nature hétérogène du mélange caillé-lactosérum. Or, les expériences précédentes ont également mis en évidence que la proportion de caillé par rapport au lactosérum dans un échantillon a une influence sur la séparation par tamisage. De ce fait, il est nécessaire d'optimiser la reproductibilité du prélèvement par rapport aux proportions de caillé et de lactosérum récupérées, afin de séparer le caillé du LEG de la manière la plus reproductible possible. Cette

optimisation est également nécessaire dans la perspective de calculer des bilans matières intermédiaires au cours de la fabrication.

Pour optimiser sa reproductibilité, le prélèvement du mélange caillé-lactosérum a été formalisé au regard de plusieurs paramètres. Le prélèvement par immersion d'un pichet dans la cuve ou bien par la vanne de soutirage a été étudié, ainsi que le sens et le moment du prélèvement par rapport au brassage de la cuve.

Dans la perspective d'étudier l'impact du délactosage sur la composition du caillé en cuve, les expérimentations fromagères prévoient un prélèvement de mélange caillé-lactosérum entre le délactosage et le soutirage de la cuve. Ce prélèvement doit-il être fait juste après le délactosage ou au contraire proche du soutirage de la cuve ? Cette perspective amène à une autre problématique :

À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?

Pour répondre à cette question, nous avons estimé l'équilibration des solutés entre le caillé et le LEG en suivant l'équilibration de la teneur en lactose dans le LEG du mélange caillé lactosérum en réponse au délactosage.

La phase 2 de la thèse a été consacrée à la résolution de ces problématiques, dont les réponses ont permis de mettre en place un protocole d'échantillonnage et de sous-échantillonnage du caillé pour la mise en œuvre du plan expérimental de la phase 3.

Les questions de recherche et stratégie de la thèse sont schématisées dans la Figure 10.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

Verrous à lever pour la mise en œuvre du plan expérimental de la phase 3

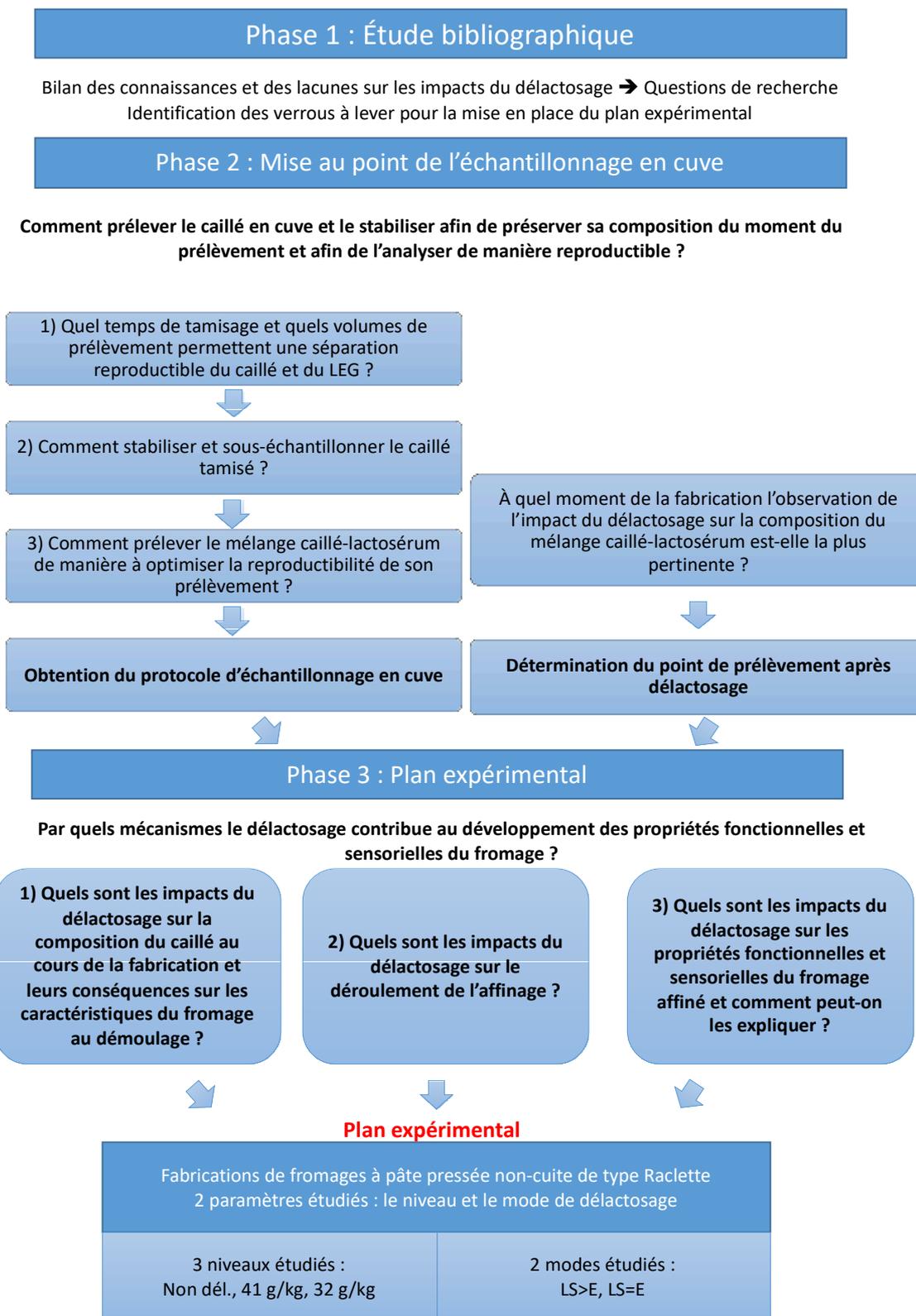


Figure 10 : Questions de recherche et stratégie de la thèse.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1 Mise au point de l'échantillonnage en cuve

1.1 Fabrications fromagères

La mise au point du protocole d'échantillonnage en cuve a nécessité plusieurs expériences qui n'ont pas toutes pu être réalisées lors de fabrications essais suivant la trajectoire technologique utilisée pour le plan expérimental (ENIL DELAC, Tableau 6). Certaines expériences ont été réalisées lors de fabrications dans la mini-fromagerie expérimentale de l'INRAE-URTAL (INRAE Raclette, Tableau 6), avec la reproduction la plus fidèle possible de la trajectoire technologique DELAC. D'autres expériences ont été réalisées lors de fabrications de Morbier à l'ENIL (ENIL Morbier, Tableau 6), la fabrication du Morbier nécessitant un délactosage.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Tableau 6 : Procédés de fabrication ayant servis à la mise au point de l'échantillonnage (MG=Matière Grasse, MAP=Matière Azotée Protéique, LS = lactosérum retiré pour le dé lactosage, E= eau ajoutée dans la cuve pour le dé lactosage, %= pourcentage par rapport au volume initial de lait dans la cuve, X g/kg = teneur en lactose cible dans le mélange caillé-lactosérum après dé lactosage).

	ENIL DELAC (Raclette)	ENIL Morbier	INRAE Raclette
Standardisation	MG/MAP = 1	MG/MAP = 1,05	MG/MAP = 0,95
Réduction bactérienne	Pasteurisation 76 °C (60 s)	Lait cru	Pasteurisation 76 °C (60 s)
Cuve	300 L	300 L	100 L
Ensemencement	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> et <i>Leuconostoc</i> (Chr. Hansen, CHN-11, 7,7 g/100 L	Mésophiles : <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> (Danisco ® MA11/14 : 10,4 DCU/100 L et MD99 : 3,5 DCU/100 L) et thermophiles : <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (BIOPROX, DI-PROX ® TY947 : 1,75 UAT/100 L)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> et thermophiles : <i>Streptococcus thermophilus</i> (Danisco ® MA4002 : 5 DCU/100 L)
Maturation	1 h, 32 °C	30 min, 32 °C	1 h, 32 °C
Emprésurage	200 IMCU/mL (Chr. Hansen, CHYMAX PLUS ®)	200 IMCU/mL (Chr. Hansen, CHYMAX PLUS ®)	Présure Berthelot 520 mg/L (Chymosine et pepsine)
Temps de prise	15 min	22-25 min	20-24 min
Temps de durcissement	7-8 min	6-7 min	4-6 min
Décaillage	5 min, taille : 0,5-0,7 cm	4 min, taille : 0,5-0,7 cm	5 min, taille : 0,5-0,7 cm
1er brassage	10 min	5 min	10 min
Dé lactosage	Non dé lactosé LS>E 41 g/kg (LS -25 % et E +13 %) LS=E 41 g/kg (LS -14 % et E +14 %) LS>E 32 g/kg (LS -38 % et E +30 %) LS=E 32 g/kg (LS -33 % et E +33 %)	E (+39 %)	LS=E 32 g/kg (LS -33 % et E +33 %)
Chauffage	5 min jusqu'à 35 °C	5 min jusqu'à 38 °C	5 min jusqu'à 35 °C
2e brassage	Non dé lactosé : 40 min LS>E 41 g/kg : 25 min LS=E 41 g/kg : 30 min LS>E 32 g/kg : 15 min LS=E 32 g/kg : 20 min	25 min	20 min

1.2 Séparation caillé/lactosérum

Lors de prélèvements d'échantillons de caillé en cuve, la séparation du caillé et du lactosérum était réalisée avec une toile de moule à Saint-Paulin (Figure 11) (\varnothing 22,5 cm) utilisée comme « tamis », placée sur un seau de 5 L permettant de récupérer le lactosérum s'écoulant. Le mélange caillé-lactosérum était prélevé en cuve avec un pichet puis immédiatement versé dans le tamis.

Un chronomètre était activé dès le début du versement du pichet dans le tamis ($t=0$ s). Lorsque le temps de tamisage nécessaire pour séparer le caillé et le LEG était atteint, le tamis était immédiatement transféré sur un deuxième seau de 5 L propre et sec permettant de récupérer le lactosérum continuant à s'exsuder. Le lactosérum exsudé après le transfert du tamis sur le deuxième seau était considéré comme faisant partie de l'échantillon de caillé, il était donc mélangé avec le caillé avant le sous-échantillonnage du caillé. Le lactosérum exsudé avant le transfert du tamis sur le deuxième seau était considéré comme du LEG.



Figure 11 : Toile de moule à Saint-Paulin.

1.3 Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ?

Le protocole de séparation du mélange caillé-lactosérum par tamisage a été mis au point en atteignant deux objectifs : 1) la détermination d'un temps de tamisage en fonction de la nature du lactosérum écoulé et 2) la détermination du volume de prélèvement permettant une séparation par tamisage la plus reproductible possible (Tableau 7).

1.4 Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner un échantillon hétérogène et instable ?

La mise au point du protocole de sous-échantillonnage du caillé tamisé a été réalisée en atteignant trois objectifs :

- 1) Le choix d'un couple vitesse/durée de mixage
- 2) Détermination de l'impact du refroidissement du caillé tamisé avant mixage sur l'hétérogénéité des sous-échantillons
- 3) Comparaison entre deux méthodes de sous-échantillonnage : par mixage du caillé tamisé et par répartition du caillé tamisé intact

Tableau 7 : Description des expériences ayant permis de mettre au point le protocole de séparation du caillé et du LEG par tamisage.

	Objectif 1 :		Objectif 2 :
	Détermination d'un temps de tamisage pour la séparation du caillé et du lactosérum		Détermination du volume de prélèvement du mélange caillé-lactosérum
Expérience	Étude du débit d'écoulement du lactosérum pendant le tamisage du caillé	Étude de l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis	Détermination du volume de prélèvement (pichet) du mélange caillé-lactosérum
Fabrication	ENIL Morbier	ENIL DELAC	ENIL DELAC
Modalités de délactosage	E (+39 %)	Non dél., 32 g/kg LS>E, 32 g/kg LS=E	Non dél., 41 g/kg LS>E, 41 g/kg LS=E, 32 g/kg LS>E, 32 g/kg LS=E
Description de la mise en œuvre	Toutes les 10 s, le poids de lactosérum écoulé à travers le tamis a été relevé.	Le lactosérum s'écoulant du tamis est échantillonné (10 mL) à intervalles de temps régulier	Des échantillons de 1 L et de 2 L de mélange caillé-lactosérum étaient prélevés avant délactosage et des échantillons de 2 L et de 3 L étaient prélevés après délactosage
Volumes de prélèvement du mélange caillé-lactosérum	1 L et 3 L	2 L	1 L, 2 L et 3 L
Moment de prélèvement	30 s avant délactosage et 10 min après délactosage pour chaque volume	30 s après la fin de la dilution de la cuve	30 s avant délactosage et 10 min après délactosage pour chaque volume
Temps de tamisage	300 s	300 s	60 s
Nombre de répétitions	4	-	5
Paramètre mesuré	Poids de lactosérum puis calcul du débit d'écoulement en g/s.	Concentration en lactose par HPAEC-PAD	Poids séparés du caillé tamisé et du LEG

L'Hétérogénéité induite par le paramètre de sous-échantillonnage étudié entre les sous-échantillons issus d'un même échantillon de caillé a été estimée avec la variation de leur teneur en MS. Les paramètres induisant la plus faible variation de teneur en MS ont été choisis.

Objectif 1 : Choix d'un couple vitesse/durée de mixage

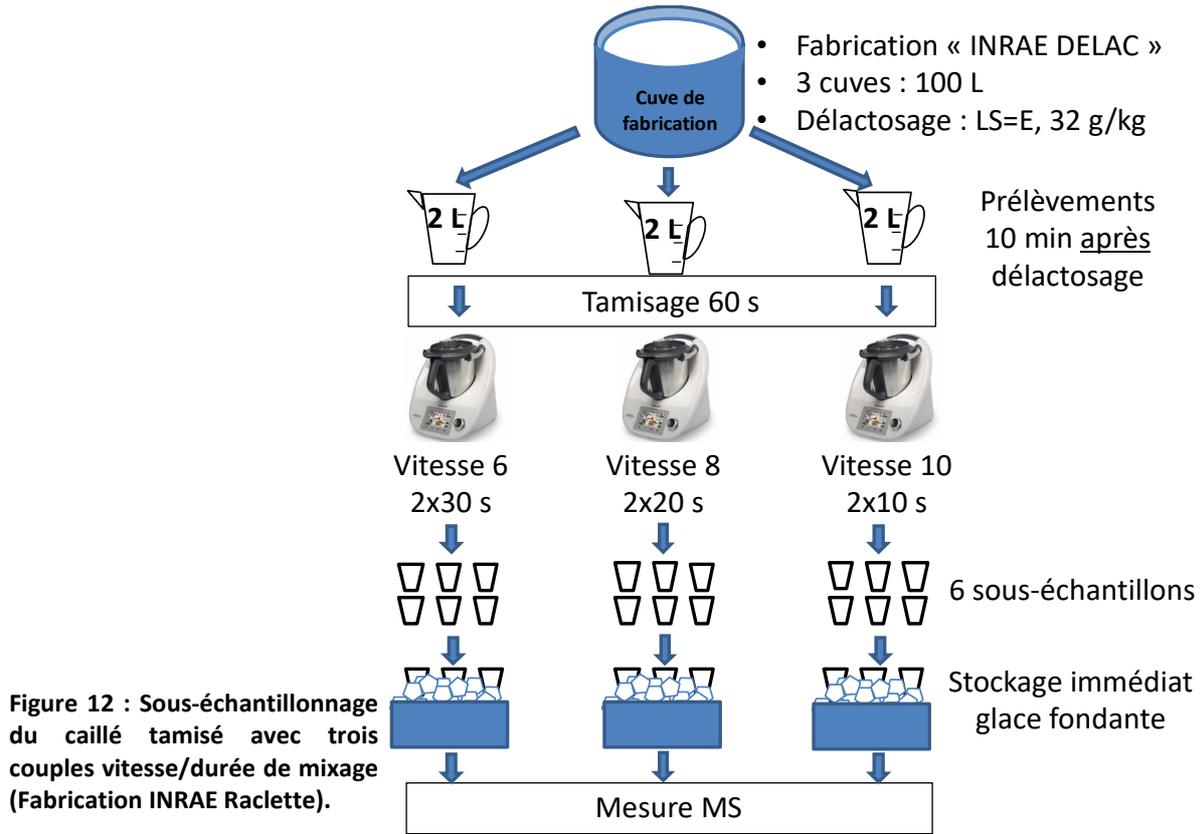


Figure 12 : Sous-échantillonnage du caillé tamisé avec trois couples vitesse/durée de mixage (Fabrication INRAE Raclette).

Objectif 2 : Détermination de l'impact du refroidissement du caillé tamisé avant mixage sur l'homogénéité des sous-échantillons

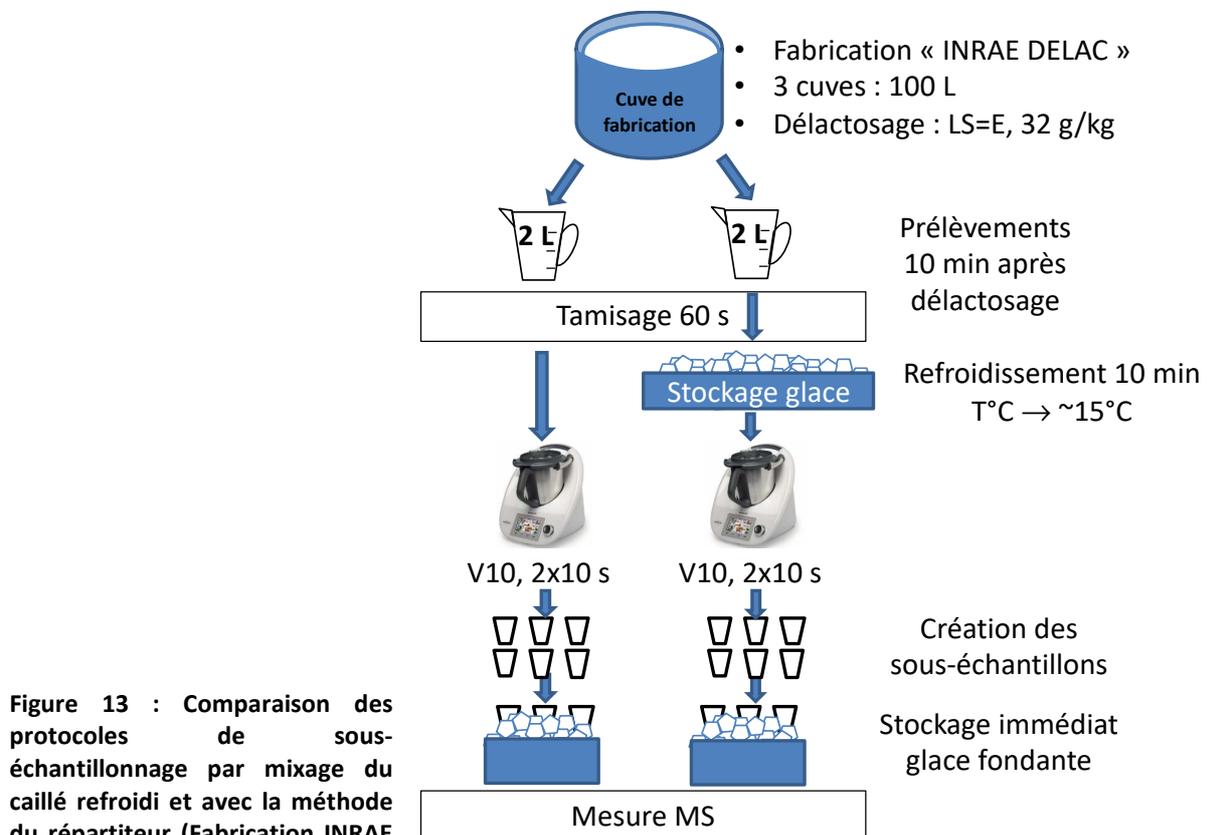


Figure 13 : Comparaison des protocoles de sous-échantillonnage par mixage du caillé refroidi et avec la méthode du répartiteur (Fabrication INRAE

Objectif 3 : Comparaison entre deux méthodes de sous-échantillonnage : par mixage du caillé tamisé et par répartition du caillé tamisé non mixé.

Deux méthodes de sous-échantillonnage étaient à notre disposition : par répartition du caillé intact et par répartition après mixage du caillé. Ces deux méthodes ont été comparées.

Le répartiteur a été fabriqué artisanalement et consiste en une boîte percée de 5 trous dont le diamètre correspond à celui des pots de prélèvement (\varnothing 55 mm) (Figure 14). Le caillé tamisé était versé dans la boîte immédiatement après le tamisage puis était réparti dans les pots par les trous.



Figure 14 : Répartition du caillé tamisé avec un répartiteur.

Le sous-échantillonnage du caillé tamisé par le répartiteur a été comparé ici avec la méthode optimisée de sous-échantillonnage par mixage : mixage du caillé refroidi ($\sim 15^{\circ}\text{C}$) au Thermomix® à vitesse 10, 2x10 s (Figure 15).

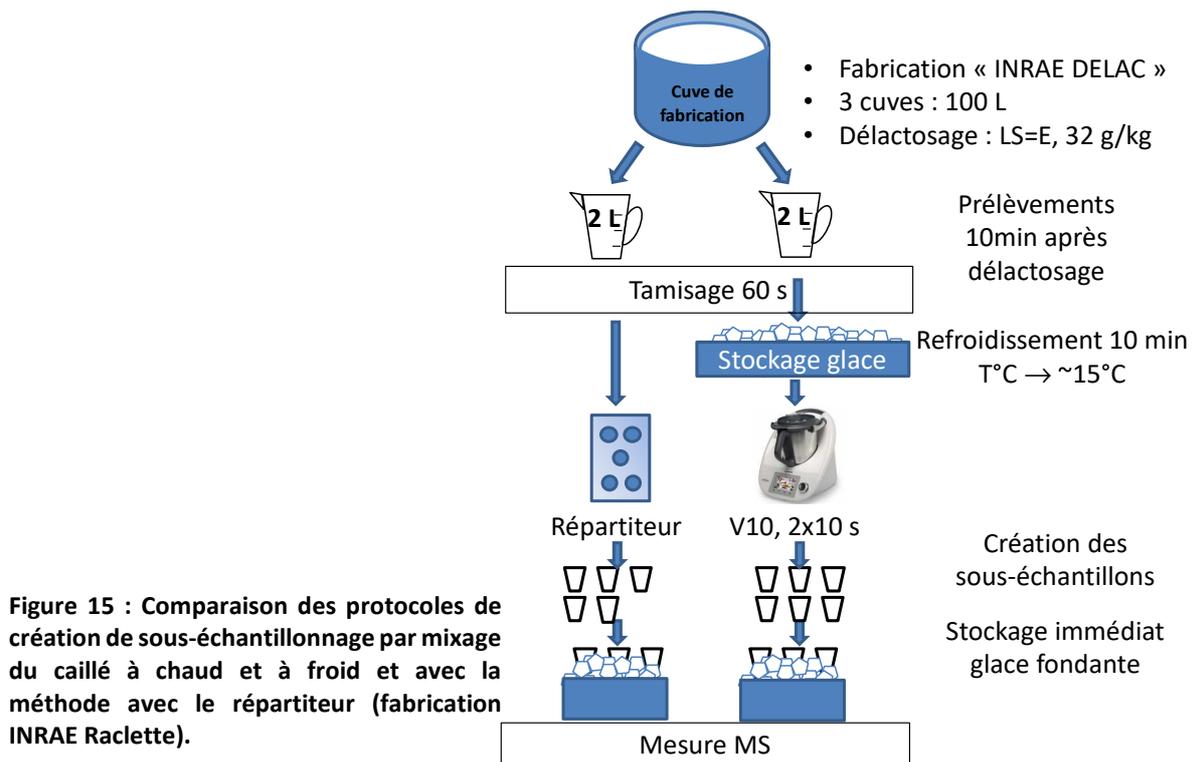


Figure 15 : Comparaison des protocoles de création de sous-échantillonnage par mixage du caillé à chaud et à froid et avec la méthode avec le répartiteur (fabrication INRAE Raclette).

Volet 3 : Comment prélever le mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement ?

La méthode de prélèvement du mélange caillé-lactosérum a été formalisée suite à l'étude de la voie de prélèvement (par immersion du pichet dans la cuve ou par la vanne de soutirage) et du sens de prélèvement dans la cuve (par rapport au sens de brassage) (Tableau 8). Le critère de sélection des paramètres était la variabilité de la proportion de caillé tamisé dans l'échantillon.

Tableau 8 : Description des expériences ayant permis de formaliser la méthode de prélèvement du mélange caillé-lactosérum.

Expérience	Détermination de la voie de prélèvement du mélange caillé-lactosérum	Détermination du sens de prélèvement du mélange caillé-lactosérum
Fabrication	ENIL Morbier	ENIL Morbier
Modalités de dé lactosage	E (+ 39 %)	E (+ 39 %)
Description de la mise en œuvre	Des échantillons de mélange caillé-lactosérum ont été prélevés par immersion du pichet dans la cuve et par la vanne de soutirage	Des échantillons de caillé-lactosérum ont été prélevés dans le sens horaire et dans le sens antihoraire
Volumes et moment de prélèvement du mélange caillé-lactosérum	2 L, 10 min après dé lactosage	1L, 30 s avant dé lactosage et 2 L, 10 min après dé lactosage
Temps de tamisage	60 s	60 s
Nombre de répétitions	15 par modalités réparties sur 3 cuves	10 par modalités réparties sur 2 cuves
Paramètre mesuré	Poids séparés du caillé tamisé et du LEG puis calcul de la proportion de caillé dans l'échantillon total	Poids séparés du caillé tamisé et du LEG puis calcul de la proportion de caillé dans l'échantillon total

1.5 À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du dé lactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?

Le moment de prélèvement « après dé lactosage » a été déterminé par rapport à la dynamique d'équilibration des solutés entre caillé et LEG après la dilution de la cuve. Cette équilibration a été estimée par rapport à l'évolution de la concentration en lactose dans le LEG au cours de la fabrication (Tableau 9).

Tableau 9 : Description de la mise en œuvre de l'expérience ayant permis la détermination du moment de prélèvement de l'échantillon de mélange caillé-lactosérum "après délactosage".

Expérience	Détermination du moment de prélèvement de l'échantillon de mélange caillé-lactosérum "après délactosage"
Fabrication	ENIL DELAC
Modalités de délactosage	Non dél., 41 g/kg LS>E, 41 g/kg LS=E, 32 g/kg LS>E, 32 g/kg LS=E
Description de la mise en œuvre	Des échantillons de lactosérum ont été prélevés à pas de temps réguliers dans la cuve entre le décaillage et le soutirage pour suivre l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum
Paramètre mesuré	Analyse de la concentration en lactose par HPAEC-PAD

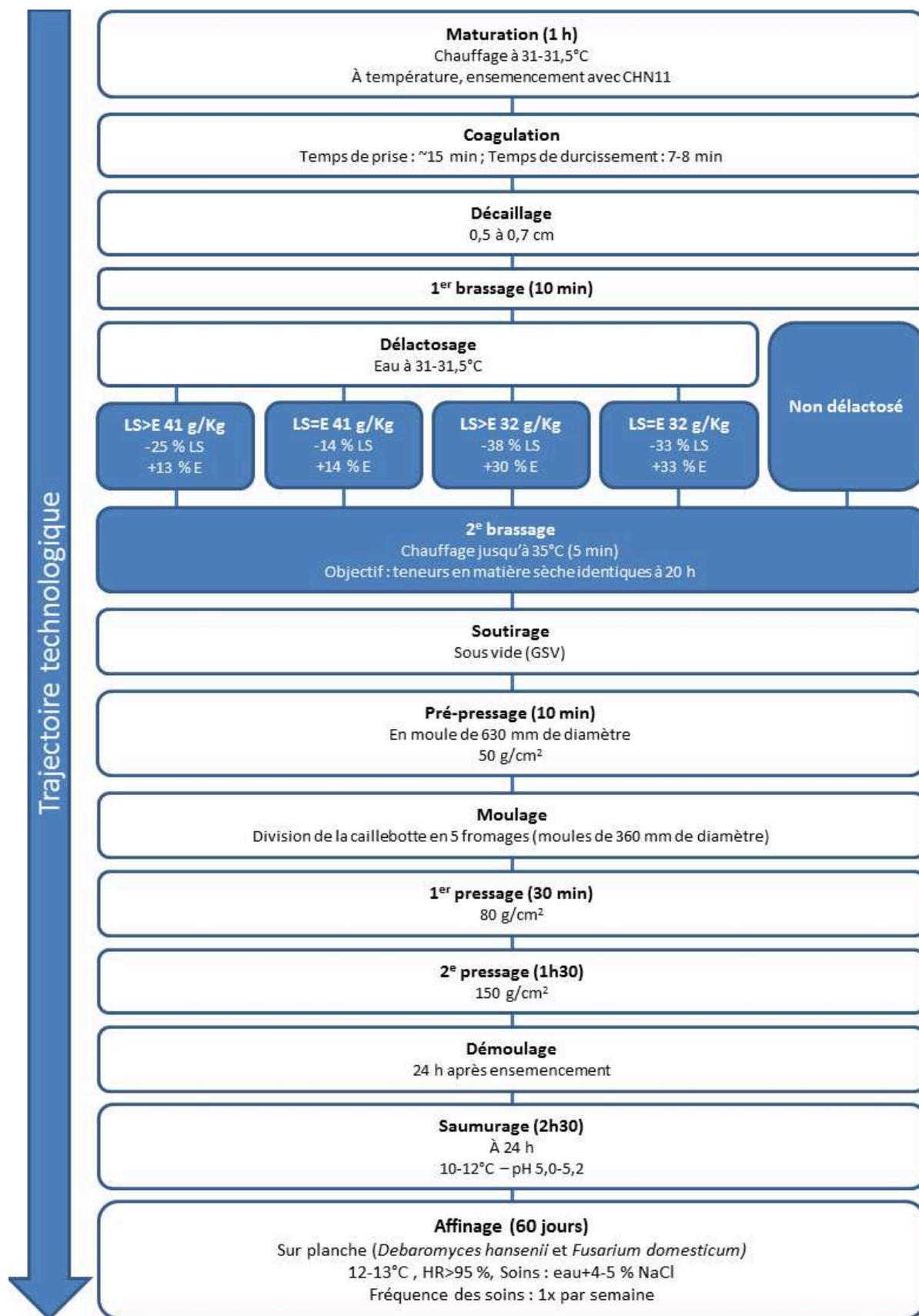


Figure 16 : Diagramme technologique de fabrication des Raclettes. Les étapes en bleu sont adaptées à chaque combinaison de facteurs (LS = proportion de lactosérum retiré pour le dé lactosage ; E = proportion d'eau ajoutée).

2 Expérimentations fromagères

2.1 Introduction

Deux paramètres de dé lactosage ont été étudiés : le niveau et le mode de dé lactosage. Au total, quatre combinaisons de paramètres ont été étudiées en plus de la cuve non dé lactosée :

1. LS>E * 32 g/kg
2. LS>E * 41 g/kg
3. LS=E * 32 g/kg
4. LS=E * 41 g/kg
5. Non dél.

Dix-huit fromages à pâte pressée non cuite de type raclette ont été fabriqués sur 3 semaines avec 2 journées de fabrications par semaine à la halle technologique de l'ENILBio selon le plan d'expérience décrit dans le Tableau 10. Chaque jour de fabrication, 3 cuves de 310 L de lait chacune étaient fabriquées : une cuve non dé lactosée et 2 cuves avec chacune une combinaison de facteurs.

Les combinaisons des facteurs du plan expérimental ont été randomisées entre les 3 cuves, sur les 2 jours de la semaine et sur les 3 semaines. Ainsi, les fabrications avec les mêmes combinaisons de facteurs étudiés, **Niveau** et **Mode** de dé lactosage, ont été réalisées dans des cuves différentes et des jours différents chaque semaine, ce qui permettait d'atténuer un éventuel impact lié à l'ordre des fabrications ou au matériel (Tableau 10).

Tableau 10 : Randomisation des combinaisons de facteurs et des cuves non dé lactosées sur les 3 semaines de fabrication.

		Cuve 1	Cuve 2	Cuve 3
Semaine 1	J1	LS=E 41 g/kg	Non dél.	LS>E 32 g/kg
	J2	Non dél.	LS>E 41 g/kg	LS=E 32 g/kg
Semaine 2	J1	LS>E 41 g/kg	LS=E 32 g/kg	Non dél.
	J2	LS>E 32 g/kg	LS=E 41 g/kg	Non dél.
Semaine 3	J1	Non dél.	LS>E 32 g/kg	LS=E 41 g/kg
	J2	LS=E 32 g/kg	Non dél.	LS>E 41 g/kg

2.2 Trajectoires technologiques

2.2.1 Préparation du lait

Les laits utilisés pour les fabrications étaient des laits de mélange provenant de 5 producteurs locaux (Jura). Ils étaient réceptionnés 48 h avant le début de la fabrication, délai représentatif de ce qui est pratiqué en industrie. Les laits étaient collectés à une température de 12 °C (température de collecte du lait exigée par l'AOP Comté) puis stockés à 4 °C. La standardisation pour amener le lait à un ratio MG/MAP égal à 1 et la pasteurisation étaient réalisées la veille de la fabrication. Pour ce faire, une partie du lait était concentrée par microfiltration sur membrane céramique (0,1 µm) et le rétentat était ajouté au lait non concentré pour obtenir une teneur en MAP de 3,7 %. La teneur en MG était ensuite réduite par ajout de lait écrémé pour obtenir une teneur en MG de 3,7 %. Une pasteurisation était effectuée à 76 °C pendant 60 s et la perte de calcium engendrée par le traitement thermique était corrigée avec un ajout de CaCl₂. Le lait était ensuite reporté à 8 °C jusqu'à la fabrication du lendemain (15 h à 18 h de report).

2.2.2 Fabrication des fromages

Les fromages ont été fabriqués suivant une trajectoire technologique type Raclette (Figure 16). Les ferments utilisés, CH-N 11 (Chr. Hansen), ont été choisis car ils sont couramment utilisés en fabrication de Raclette. Le coagulant utilisé est la chymosine CHY-MAX® Plus (Chr. Hansen), qui est également l'un des coagulants les plus couramment utilisés en fabrication de Raclette. L'itinéraire technologique a été le même pour toutes les fabrications sauf pour deux étapes : le délactosage (% LS et E indicatifs), et le brassage après délactosage (2^e brassage). Les temps technologiques et les heures de prélèvement de tous les échantillons ont été relevés systématiquement.

2.2.3 Délactosage

Pour chaque fabrication, les volumes de lactosérum retiré et d'eau ajoutée étaient adaptés à la teneur en lactose du lait standardisé, mesurée par analyseur infra-rouge (Milkoscan). Le Tableau 11 présente les proportions de lactosérum retiré et d'eau ajoutée pour atteindre les cibles de teneurs en lactose. Ces proportions sont exprimées en pourcentage massique par rapport au poids initial de lait dans la cuve.

Tableau 11 : Proportions de lactosérum retiré et d'eau ajouté en fonction du jour de fabrication et des objectifs de niveau et de mode de dé lactosage. LS= % de lactosérum retiré et E= % d'eau ajoutée.

Date de fab.	N° de fab. (n° de cuve)	[lactose] du lait (mesure IR en g/kg)	« Niveau » [lactose] totale ciblée (g/kg)	« Mode »	Lactosérum retiré LS (%)	Eau de dilution E (%)
11/09/19	1	44,92	41	LS=E	9.03	9.03
	2		Non dél.			
	3		32	LS>E	38.06	24.84
12/09/19	4	45,50	Non dél.			
	5		41	LS>E	25.16	8.06
	6		32	LS=E	29.03	29.03
18/09/19	7	45,94	41	LS>E	25.16	9.35
	8		32	LS=E	30.00	30.00
	9		Non dél.			
19/09/19	10	46,38	32	LS>E	38.06	27.42
	11		41	LS=E	11.94	11.94
	12		Non dél.			
25/09/19	13	46,16	Non dél.			
	14		32	LS>E	38.06	26.77
	15		41	LS=E	10.97	10.97
26/09/19	16	45,74	32	LS=E	31.61	31.61
	17		Non dél.			
	18		41	LS>E	25.16	9.03

Le retrait de lactosérum précédent la dilution était réalisé par la vanne de soutirage. Une crépine était alors disposée dans la cuve devant l'entrée de la vanne pour éviter toute perte de caillé. Ce dispositif nécessitait l'arrêt du brassage de la cuve pendant le temps du retrait (quelques minutes) car il empêchait le passage des brassoires. Le brassage était réactivé directement après la fin du retrait du lactosérum.

2.2.4 Ajustement du temps de travail en cuve

Le temps total de travail du mélange caillé-lactosérum en cuve a été ajusté de façon à obtenir une teneur en MS similaire dans tous les fromages : entre 51 et 52 % (Figure 17).

La durée du 1^{er} brassage a été fixée à 10 min pour égoutter le caillé suffisamment avant le dé lactosage et afin d'avoir suffisamment de lactosérum dans la cuve pour effectuer le dé lactosage. Le 2^e brassage débutait avec une étape de chauffage de la cuve qui durait 5 min et durant laquelle la température était augmentée progressivement de 30-32 °C à 35 °C. C'est avec l'adaptation de la durée du 2^e brassage que l'égouttage du caillé a été contrôlé.

Ces temps technologiques sont le résultat d'une mise au point expérimentale à l'ENILBio pour ajuster la teneur en MS des fromages.

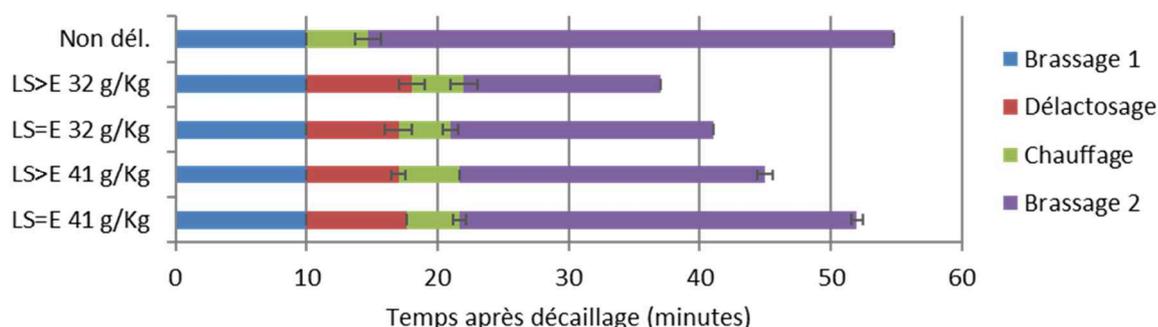


Figure 17 : Temps technologiques réalisés entre la fin du décaillage (0 min) et le soutirage.

2.2.5 Pressage

Lors du soutirage, le caillé était pré-pressé dans un moule de 630 mm de diamètre puis le gâteau de caillé était divisé en 5 parts égales tracées avec un emporte-pièce (Figure 18). Chaque part était placée dans 1 moule de 360 mm de diamètre pour être pressée (Figure 18). Les fromages ont été numérotés de 1 à 5, accompagnés du numéro du jour de fabrication et étaient mis sous presse à chaque fois dans le même ordre (presse à colonne) (Figure 18). Ainsi, une cuve de fabrication permettait de fabriquer 5 fromages de type Raclette d'environ 7 kg.

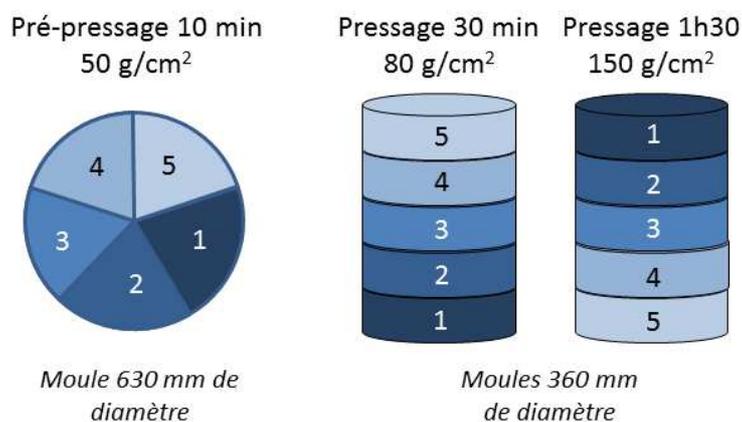


Figure 18 : Découpage et pressage du caillé issu d'une cuve de fabrication.

2.3 Suivi analytique

2.3.1 À réception du lait

Des premières analyses étaient réalisées à réception du lait, 48 h avant la fabrication afin de contrôler la qualité microbiologique du lait (flore mésophile aérobie totale, FMAR) et sa qualité sanitaire (nombre de cellules somatiques).

2.3.2 Au cours de la fabrication

Des échantillons de lait, caillé humide, lactosérum, eau de dilution et caillé pressé étaient prélevés depuis la mise en cuve du lait jusqu'à la fin du pressage pour suivre la composition tout au long de la fabrication. Au total, 9 stades étaient prélevés pendant la fabrication (Figure 19).

2.3.3 En début et en fin d'affinage

Au démoulage (24 h après le début de la fabrication), des échantillons de fromage étaient prélevés avant le saumurage. L'analyse de ces échantillons a permis de dresser le bilan des impacts des paramètres de fabrication sur les caractéristiques physico-chimiques, les populations microbiennes et l'activité protéolytique des fromages au démoulage (Figure 20). Les bilans matières et rendements ont été réalisés à partir des poids des fromages à 24 h et des poids de lactosérum récupérés des fabrications (lactosérum retiré pour le délactosage + lactosérum récupéré au soutirage + lactosérum récupéré après pré-pressage).

En fin d'affinage, les propriétés fonctionnelles et sensorielles des fromages ont été étudiées (Figure 20). Elles ont été accompagnées d'analyses de compositions physico-chimiques et microbiologiques, et d'analyses de la protéolyse pour apporter des informations sur les mécanismes de développement de ces propriétés (Figure 20).

	Etapes de fabrication	Points de prélèvements	Analyses			
			Analyses physico-chimiques	Microbiologie	Rhéologie	
Lait		Avant maturation	<ul style="list-style-type: none"> • MG, MS, • Azote (NT, NS, NPN) • Sucres • A. organiques • Minéraux (Ca, P) totaux et solubles 	<ul style="list-style-type: none"> • FMAR • Coliformes 		
	Maturation	Fin maturation	<ul style="list-style-type: none"> • Sucres, • A. organiques • Minéraux (Ca, P) totaux et solubles • Plasmine et plasminogène 	LAB		
Caillé, Lactosérum et eau	Coagulation, Décaillage et 1 ^{er} brassage	1 min avant fin brassage	<ul style="list-style-type: none"> • MS, MG • Sucres (lactose glucose, galactose) • Azote total • Minéraux (Ca, P) 			
	Dé lactosage	Dilution (eau)	<ul style="list-style-type: none"> • Calcium (eau) 	FMAR et coliformes (eau)		
	Chauffage + 2 ^e brassage	15 min après début brassage				
		1 min avant fin brassage				
Caillé pressé	Pré-pressage	Après 10 min de pré-pressage				
	1 ^{er} pressage	Après 30 min de pressage				
	2 ^e pressage					
		Après 2h de pressage		LAB	CUVC	

Figure 19 : Suivi analytique pendant la fabrication (MG=Matière Grasse, MS=Matière Sèche, NT=azote total, NS=azote soluble, NPN=azote non protéique, FMAR=Flora Mésophile Aérobie Revivifiable, LAB=bactéries lactiques, CUVC=compression uniaxiale à vitesse constante).

	Points de prélèvements	Analyses			
		Analyses physico-chimiques	Microbiologie	Analyses protéolyse	Propriétés fonctionnelles et sensorielles
Fromages en cours d'affinage	Démoulage (24h)	<ul style="list-style-type: none"> Sucres A. organiques Minéraux totaux et solubles (Ca, P) MG, MS a_w Pouvoir tampon pH 	<ul style="list-style-type: none"> Coliformes LBHF LAB 	<ul style="list-style-type: none"> Plasmine/plasminogène Activité protéases acides Azotes (NT, NS, NPN) 	
	J+2	<ul style="list-style-type: none"> Sucres A. organiques Minéraux totaux et solubles (Ca, P) MG, MS NaCl a_w pH 			
	J+5				Microstructure
	J+30	<ul style="list-style-type: none"> pH 	<ul style="list-style-type: none"> LBHF LAB 		
	J+60 (Fin affinage)	<ul style="list-style-type: none"> MG, MS NaCl pH 	<ul style="list-style-type: none"> Coliformes LBHF LAB 	<ul style="list-style-type: none"> Azotes (NT, NS, NPN) Fractions caséiques Profils peptidiques 	<ul style="list-style-type: none"> Rhéologie Aptitudes culinaires Analyse sensorielle Microstructure

Figure 20 : Suivi analytique pendant l'affinage (MG=matière grasse, ES=extrait sec, NT=azote total, NS=azote soluble, NPN=azote non protéique, LAB=bactéries lactiques, LBHF=lactobacilles hétérofermentaires facultatifs).

2.4 Plan de prélèvement

2.4.1 Prélèvements et échantillonnage du caillé et lactosérum en cuve

Les échantillons des différentes fabrications ont été prélevés à des temps technologiques identiques pour pouvoir être comparés.

Trois échantillons de caillé-lactosérum étaient prélevés en cuve (Figure 21). Le premier était prélevé 1 minute avant la fin du brassage 1 ; il était donc identique pour toutes les fabrications. Le deuxième échantillon était prélevé dans le but d'étudier l'impact complet du délactosage. Ce point a été choisi de façon à ce que le temps de brassage soit identique pour toutes les fabrications et se situe 15 minutes après le début de l'étape de chauffage. Le troisième échantillon de caillé-lactosérum était prélevé afin d'étudier l'impact total du travail en cuve sur la composition du caillé. Ce troisième échantillon était prélevé 1 minute avant le soutirage de la cuve.

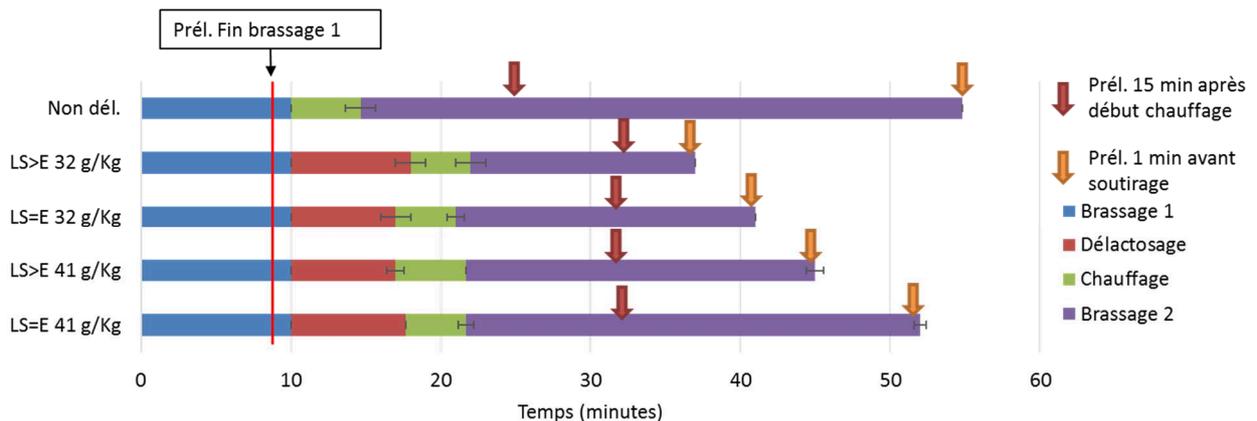


Figure 21: Points de prélèvements fin brassage 1, après délactosage et avant soutirage en fonction des temps technologiques réalisés.

Les échantillons en cuve étaient prélevés, et sous-échantillonnés suivant les protocoles décrits Figure 22, protocoles déterminés suite à la mise au point de l'échantillonnage.

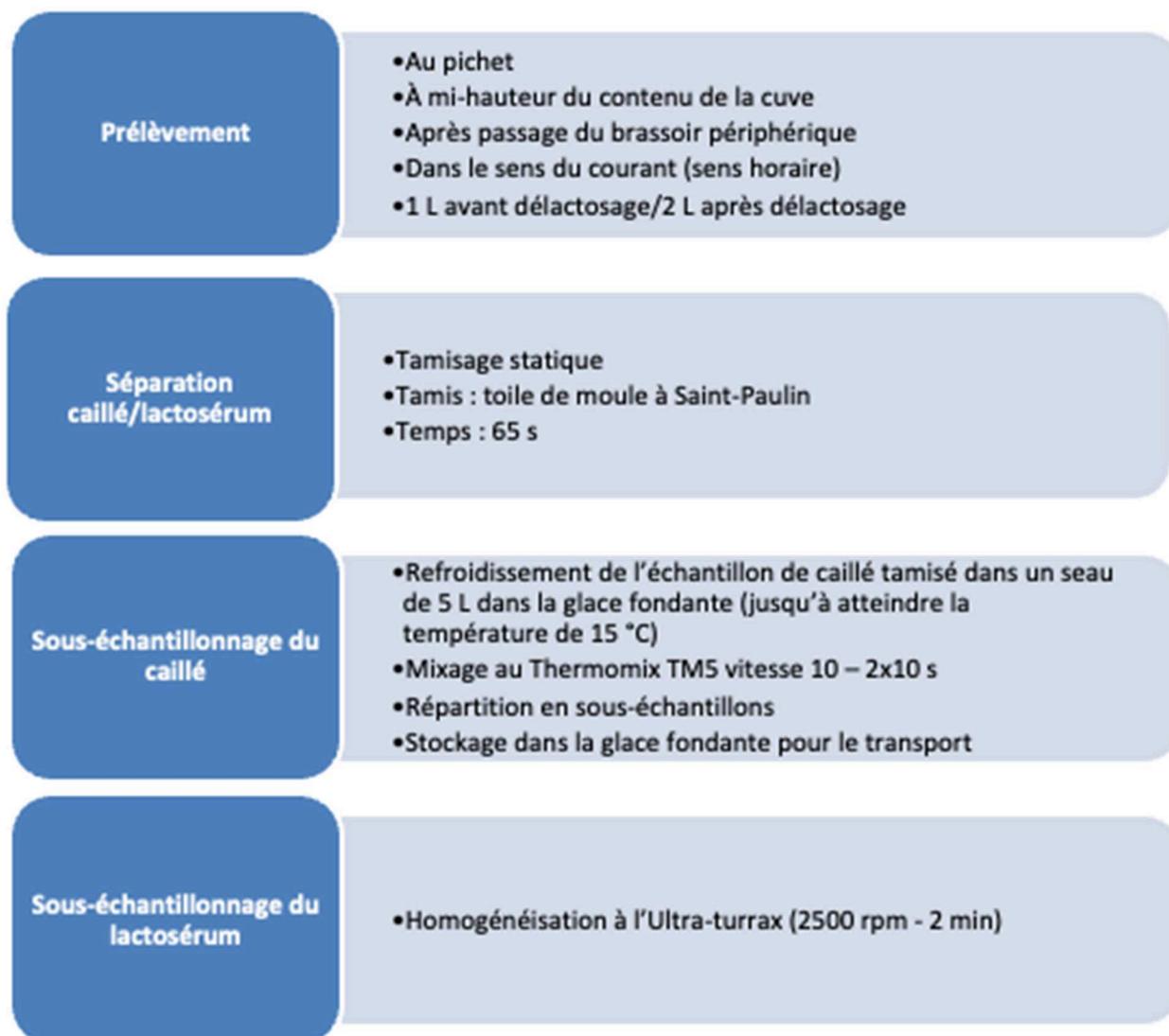


Figure 22 : Protocole de prélèvement, d'échantillonnage et de sous-échantillonnage du caillé et du lactosérum.

2.4.2 Prélèvements des échantillons de fromage

Cinq fromages étaient obtenus à partir d'une cuve de fabrication et chacun d'eux pouvait être utilisé à un ou plusieurs stades de prélèvement en fonction de la quantité de fromage nécessaire pour le suivi analytique pendant l'affinage (Figure 23). Les analyses de suivi à partir de 30 min de pressage ont donc potentiellement été réalisées sur des fromages différents mais issus de la même cuve de fabrication (le pH par exemple).

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

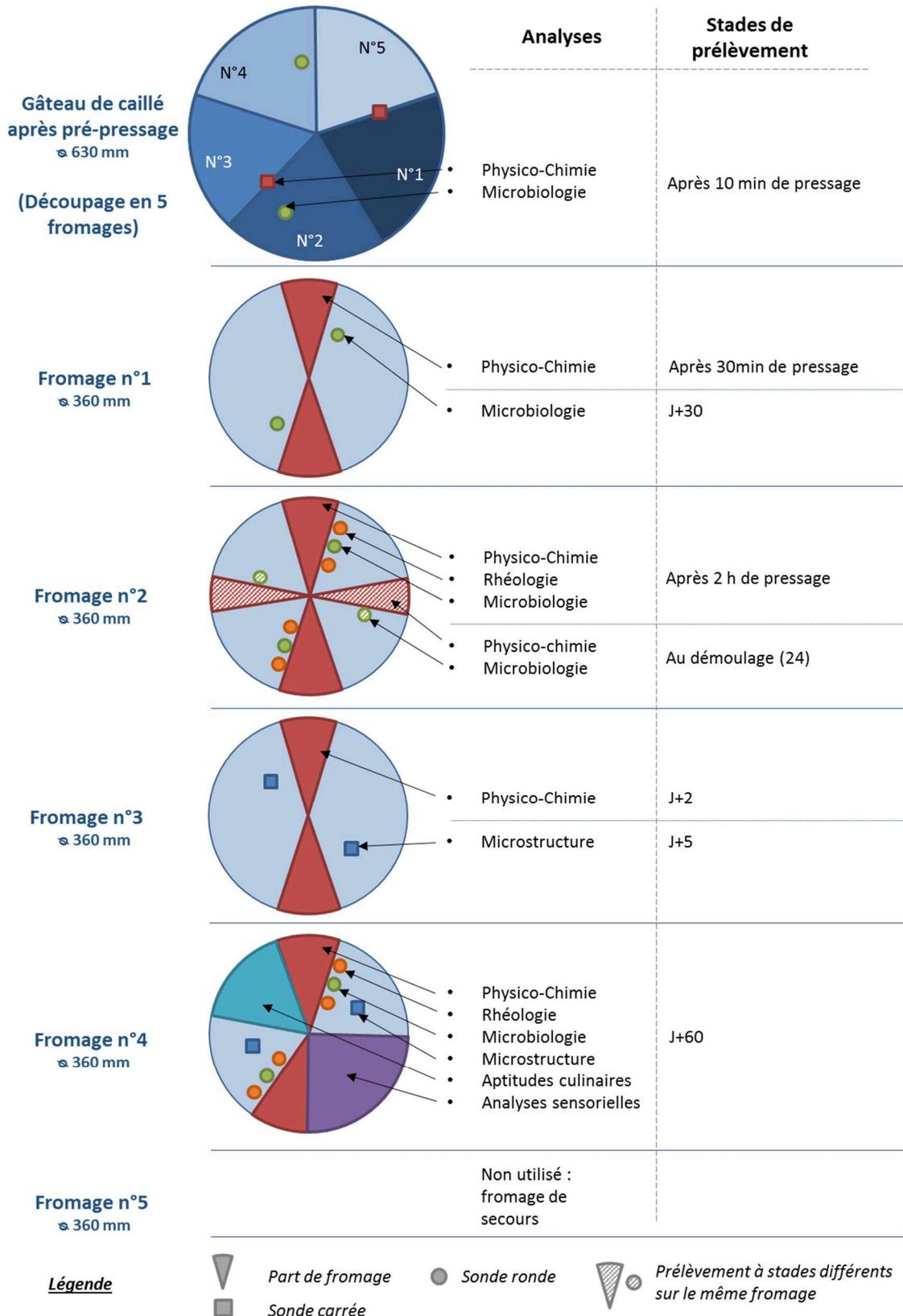


Figure 23 : Schéma d'échantillonnage des fromages depuis le pré-pressage jusqu'à fin affinage. Les figures de même couleur sur un même fromage font partie du même échantillon.

Afin que l'échantillonnage soit le plus représentatif possible du fromage, il était réalisé suivant la norme ISO 707 (2008) recommandant le prélèvement de deux morceaux opposés par rapport au centre du fromage lorsque la quantité de fromage le permettait. Les morceaux opposés prélevés étaient ensuite rassemblés puis stockés avant d'être sous-échantillonnés. Les échantillons prélevés jusqu'au stade après 2 h de pressage étaient stockés dans des sacs en plastique stériles et dans la glace fondante. Ceux prélevés pendant l'affinage étaient stockés en chambre froide à 4 °C. Les sous-échantillons sont obtenus par mixage au Thermomix® vitesse 10 – 3 x 7 s. Le couple vitesse 10 – 2x10 s n'a pas été utilisé à cause de la texture du fromage en cours d'affinage. Le fromage étant plus pâteux, il est plus efficace de mixer moins longtemps (7 s au lieu de 10 s) et de rassembler le fromage au centre du bol plus souvent (3x au lieu de 2x).

2.4.3 Récupération du lactosérum

Le lactosérum de chaque fabrication était récupéré pour pouvoir étudier l'impact des paramètres de délactosage sur la quantité de lactosérum produit en fin de fabrication. Les lactosérums retirés pour le délactosage et récupérés au soutirage étaient transvasés dans une cuve sur pesons pour en connaître le poids. Les lactosérums exsudés pendant le pré-pressage et pendant les trente premières minutes de pressage étaient récupérés dans un seau puis ajoutés à la cuve sur pesons. Le lactosérum exsudé pendant le reste du pressage (1 h 30) n'était pas récupéré car à partir de ce moment, les fromages de toutes les fabrications (initialement décalées dans le temps) étaient sur la presse dont le design ne permettait pas de séparer les effluents de chaque fabrication.

Les quantités de lactosérum produit ont également été estimées par calcul en soustrayant le poids de tous les échantillons prélevés et le poids des fromages produits à la quantité de lait initiale de chaque fabrication et en ajoutant le poids réel d'eau ajoutée.

3 Analyses Statistiques

Tous les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel XLStat version 2019.4.2 (Paris, France).

3.1 Etude de l'effet « jour »

Les fabrications ont été réalisées sur 3 semaines, 2 jours par semaine. Les variations pouvant subvenir entre ces 3 semaines et biaisant potentiellement les résultats ont été lissées en randomisant les combinaisons de facteurs sur les 3 semaines (Tableau 10).

L'ensemble des combinaisons de facteurs étant fabriqué sur 2 jours, il est nécessaire de caractériser l'effet « jour », pouvant créer un biais dans les résultats. L'impact du facteur « Jour » a été testé sur les cuves non dé lactosées car ces modalités ont été fabriquées chaque jour. Un test ANOVA a été utilisé pour tester l'impact du facteur « Jour » sur les variables suivantes :

- Teneur en MS du lait avant maturation
- Teneur en matière grasse du lait avant maturation
- Teneur en protéine du lait avant maturation
- Teneur en MS du caillé au soutirage
- pH du caillé au soutirage
- Teneur en MS du fromage à 20 h
- pH du fromage à 20 h

Le facteur « Jour » a 2 niveaux : la fabrication non dé lactosée du premier jour de fabrication de chaque semaine a été codée « Jour 1 » et celle du deuxième jour a été codée « Jour 2 ». La significativité de l'impact du facteur « Jour » a été calculée avec un seuil de 5 %.

3.2 Impacts des facteurs sur les variables mesurées

Les impacts des facteurs « Niveau », « Mode » et de leur interaction (« Niveau * Mode ») ont été testés par ANOVA avec un seuil de significativité de 5 % sur l'ensemble des 18 fabrications. La fabrication non dé lactosée est considérée comme un « Niveau » mais n'est pas considérée comme un « Mode ». Le test d'une variable par ANOVA doit donc se faire avec 2 modèles : (n=6)

1. ANOVA à 1 facteur permettant de tester le facteur « Niveau » : **non dé lactosé** (n=6), **41 g/kg** (n=6) et **32 g/kg** (n=6)
2. ANOVA à 2 facteurs permettant de tester l'impact du facteur « Mode » et l'interaction « Niveau * Mode » :
 - « Niveau » : **41 g/kg** (n=6) et **32 g/kg** (n=6)
 - « Mode » : **LS>E** (n=6) et **LS=E** (n=6)

Pour le traitement des résultats d'analyse sensorielle, 2 facteurs ont été ajoutés au modèle pour une meilleure résolution du modèle : facteurs « Juge » et « Semaine ». Si un de ces deux facteurs n'a pas été significatif, il a été retiré du modèle pour l'obtention du résultat final.

Lorsqu'un des deux facteurs (« Niveau » ou « Mode ») avait un effet significatif sur la variable étudiée, les modalités du facteur ont été testées avec le test de Tukey pour comparer leur moyenne.

Le Tableau 12 présente les groupes analytiques et variables sur lesquels l'impact du niveau, du mode et de l'interaction niveau*mode a été étudié.

Tableau 12 : Variables sur lesquelles a été testé l'impact des facteurs et stades de prélèvement correspondant.

	Variables	Stades				
		Pendant la fabrication	J+1, J+2	J+5	J+30	Fin affinage (J+60)
Composition	Sucres	X	X			
	Acides Organiques	X	X			
	Minéraux	X	X			
	Pouvoir tampon		X			
	pH	X	X		X	X
	MG	X	X			X
	EST	X	X			X
	ESD		X			X
	G/S		X			X
	HFD		X			X
	NT	X	X			X
Microbiologie	Lactocoques et Leuconostocs, LBHF	X	X			X
Azote et activités protéolytiques	NS, NPN		X			X
	Fractions caséiques					X
	Activité Protéases Acides		X			
	Activité Plasmine/plasminogène		X			
	Profils peptidiques					X
Caractéristiques fonctionnelles et sensorielles	Rhéologie		X			X
	Microstructure			X		X
	Aptitudes culinaires					X
	Analyses sensorielles					X

3.3 Détermination de la significativité de la différence entre deux populations bactériennes

La significativité des différences entre deux populations bactériennes a été déterminée telle que décrit par Achilleos & Berthier (2013). C'est-à-dire que deux populations bactériennes C1 et C2 sont considérées comme étant significativement différentes lorsque le ratio C1/C2 est supérieur à 2.

3.4 Impacts des variables quantitatives entre elles

3.4.1 Coefficient de corrélation

L'impact de variables quantitatives entre elles a été estimé avec le calcul du coefficient de Pearson (r) dont la valeur varie entre -1 et 1. Une valeur proche de -1 indique une forte corrélation négative entre les deux variables, une valeur proche de 1 indique une forte

corrélation positive entre les deux variables et une valeur proche de 0 indique une absence de corrélation. La significativité de la corrélation a été calculée avec un seuil de 5 % en dessous duquel deux variables ont été considérées comme étant corrélées.

3.4.2 Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP a été utilisée pour représenter graphiquement des jeux de données composés de plus de 3 variables dans un espace multidimensionnel. Parmi plusieurs composantes calculées, 2 ont été choisies pour constituer les axes du graphique. Les composantes présentant le plus grand pourcentage d'inertie expliquée ont été choisies.

3.5 Études de cinétiques

Des cinétiques ont été modélisées en fonction du temps par régression linéaire simple. Lorsqu'un point d'inflexion était recherché entre deux tendances au sein d'une même cinétique, les deux tendances étaient modélisées et le point d'intersection des modèles était considéré comme le point d'inflexion de la cinétique.

3.6 Régression PLS

La régression PLS (Partial Least Squares) ou régression par les moindres carrés partiels a été utilisée pour créer des modèles prédictifs lorsque les variables utilisées étaient colinéaires, ce qui empêche leur utilisation dans le cadre de la régression linéaire. Les variables ont été choisies en fonction du critère VIP (variable importante pour la prédiction) calculé par le logiciel, qui détermine l'importance de la variable dans le modèle de prédiction. Les variables sont estimées importantes lorsque le critère VIP est supérieur ou égal à 80 %. Les variables ont également été choisies de manière à optimiser la RMCE (racine de la moyenne des carrés des erreurs).

4 Analyses

4.1 Répartition analytique

Plusieurs laboratoires ont été sollicités pour réaliser les analyses sur les échantillons issus des expérimentations fromagères (Tableau 13).

Tableau 13 : Laboratoires sollicités en fonction du type d'analyse réalisé.

Groupe d'analyse	Analyse	Laboratoire	Localité
Caractérisation physico-chimique	MS	INRAE-URTAL	Poligny
	MG	Lait, caillé, fromage : INRAE-URTAL Lactosérum : ACTALIA CECALAIT	Poligny
	Sucres	INRAE-URTAL	Poligny
	Acides organiques	INRAE-URTAL	Poligny
	Minéraux	INRAE-URTAL	Poligny
	pH	ISBA ENILBio	Poligny
	Pouvoir tampon	ISBA ENILBio	Poligny
	Activité de l'eau	ISBA ENILBio	Poligny
	NaCl	INRAE-URTAL	Poligny
Microbiologie	Dureté de l'eau	ISBA ENILBio	Poligny
	Suivi analytique (Lait, caillé, fromage)	INRAE-URTAL	Poligny
	Bactéries pathogènes (fromages à déguster)	ACTALIA Contrôle et qualité	Mamirolles
Qualité sanitaire du lait	Eau	Laboratoire d'analyse départemental du Jura	Poligny
	Cellules somatiques	ACTALIA CECALAIT	Poligny
Azote et activités protéolytiques	Fractions azotées	INRAE/ ACTALIA CECALAIT	Poligny
	Activité plasmine/plasminogène	INRAE-URTAL	Poligny
	Activité protéases acides	INRAE-URTAL	Poligny
	Profils peptidiques	INRAE-URTAL	Poligny
	Fractions caséiques	UMR GABI	Jouy-en-Josas
Propriétés sensorielles et fonctionnelles	Rhéologie	INRAE-URTAL	Poligny
	Aptitudes culinaires	ACTALIA Produits Laitiers	Rennes
	Analyses sensorielles	ACTALIA Sensoriel	Bourg-en-Bresse
	Microstructure	Dimacell	Dijon

4.2 Techniques analytiques

4.2.1 Caractérisation physico-chimique

4.2.1.1 Matière sèche (MS)

La teneur en matière sèche totale des échantillons :

- De lait et lactosérum a été déterminée selon la méthode de référence (ISO 6731, 2011).
- De caillé et fromage a été déterminée selon la méthode de référence (ISO 5534, 2004).

4.2.1.2 Matière grasse (MG)

La teneur en matière grasse des échantillons :

- De lait a été déterminée par la méthode Gerber (ISO 19662, 2018).
- De caillé et fromage a été déterminée par la méthode acido-butyrique (NF V 04-287, 2017).
- De lactosérum a été déterminée par la méthode gravimétrique (ISO 7208, 2008).

Plusieurs indicateurs ont été calculés à partir des MS et MG avec les formules suivantes :

- Rapport gras/sec (G/S) : $G/S (\%) = (MG/MS) \times 100$
- Extrait sec dégraissé (ESD) : $ESD (\%) = (MS-MG) \times 100$
- Humidité du fromage dégraissé (HFD) : $HFD (\%) = [(100-MS)/(100-MG)] \times 100$

4.2.1.3 Sucres

Les sucres ont été analysés selon la procédure interne d'INRAE-URTAL qui a été déployée et optimisée pour le projet DELAC.

La préparation des échantillons solides (caillé, fromage) a notamment été optimisée : la dispersion de ces matrices dans un tampon citrate permet de maximiser la précipitation des protéines et matière grasse quel que soit le pH de l'échantillon. Toutes les matrices (lait, caillé, lactosérum et fromage) ont été analysées après dispersion dans ce tampon.

La séparation des sucres des échantillons a été réalisée par HPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography – pulsed amperometric detection) avec un système Dionex dans une colonne CarboPac PA-1 (250 mm x 2 mm) et une précolonne CarboPac PA-1 (50 mm x 2 mm). Pour la séparation, les échantillons ont été élués avec un gradient d'hydroxyde de sodium et d'acétate de sodium. Les sucres séparés ont été détectés en sortie de colonne par ampérométrie pulsée puis quantifiés par intégration du pic en référence à une gamme de calibration. Chaque échantillon a été mesuré avec deux répétitions.

4.2.1.4 Acides organiques

Les acides organiques ont été analysés selon la procédure interne INRAE-URTAL. Cinq acides organiques ont été identifiés et quantifiés : l'acide lactique, l'acide citrique, l'acide orotique, l'acide urique et l'acide hippurique.

Les échantillons ont été dispersés à l'ultra-turrax dans un tampon acide (acide sulfurique 50 mM). Leur phase aqueuse a ensuite été séparée des protéines non solubles et de la matière grasse par ultracentrifugation à 20 800g puis analysée par chromatographie liquide.

Les acides organiques en solution ont été séparés sur une colonne d'exclusion Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) et une pré-colonne Microguard Cation H+ (30 mm x 4,6 mm). La séparation a été réalisée par élution isocratique dans l'acide sulfurique (0.009 N. Les acides organiques ont été détectés en sortie de colonne par détection UV à 205 nm (détecteur à barette de diodes Ultimate 3000 DAD). Ils ont ensuite été quantifiés par intégration du pic en référence à une gamme de calibration. Chaque échantillon a été mesuré avec deux répétitions.

4.2.1.5 Minéraux

Préparation des échantillons

Les échantillons pour la mesure du Ca et du P totaux ont été préalablement minéralisés selon la norme ISO 8070 (2007).

Pour l'analyse des minéraux solubles, la phase aqueuse des échantillons de lait et lactosérum a été séparée par ultrafiltration des tubes Vivaspin turbo 15 5000 MWCO (Sartorius) centrifugés à 20 °C et 3 220 g pendant 60 min (lait) et 120 min (lactosérum). La phase aqueuse des échantillons de caillé et de fromage a été ultrafiltrée sur AmiconUltra 3 kDa 0,5 mL Ultracel (Millipore) à 20 °C et 14 000 g pendant 30 min.

Analyse chromatographique

Les anions et les cations ont été dosés sur la même chaîne de chromatographie ionique (Dionex).

Les cations ont été séparés à 25 °C sur colonne IonPac CS12A 250 x 2 mm (Dionex) précédée d'une pré-colonne IonPac CG12A 50 x 2 mm (Dionex) dans une solution isocratique d'acide méthane sulfonique 20 mM. La sensibilité de la détection a été augmentée par suppression des anions (CSRS Ultra II self regenerating 2 mm, Dionex). En sortie de colonne, les cations ont été détectés par conductimétrie (10 Hz). Ils ont ensuite été quantifiés par intégration de la surface du pic en référence à une gamme de calibration.

Les anions ont été séparés à 25 °C sur colonne IonPac AS11 250 x 2 mm (Dionex) précédée d'une pré-colonne IonPac AG11 50 x 2 mm (Dionex) dans un gradient de 3 solvants : eau ultrapure, NaOH 2 mM et NaOH 100 mM. La sensibilité de la détection a été augmentée en piégeant les carbonates en solution avec un filtre IonPac ATC-HC 9 x 75 mm (Dionex) et en éliminant les cations en solution (ASRS Ultra II self regenerating 2 mm, Dionex). En sortie de colonne, les anions ont été détectés par conductimétrie (10 Hz). Ils ont ensuite été quantifiés par intégration de la surface du pic en référence à une gamme de calibration. Chaque échantillon a été mesuré en deux fois. Les concentrations en minéraux totaux sont déterminées en mg/kg d'échantillon total (matrice + phase aqueuse) et les concentrations en minéraux solubles sont déterminées en mg/kg de phase aqueuse extraite.

Estimation des teneurs en Ca INSOL

Les teneurs en calcium associé aux caséines en début d'affinage ont été estimées par la soustraction de la quantité de minéraux solubles à la quantité de minéraux totaux par la formule suivante :

$$\% \text{ de Ca INSOL} = \frac{\text{Concentration totale} - \left(\frac{(1000 - EST)}{1000} \right) \times \text{concentration dans la phase aqueuse}}{10}$$

Avec :

- Concentration totale en g/kg
- Concentration dans la phase aqueuse en g/kg
- EST caillé en g/kg

4.2.1.6 pH

Le pH a été mesuré avec une sonde de pénétration (incertitude = 0,1)

Le pH des fromages a été mesuré sur des échantillons non broyés.

4.2.1.7 Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon des fromages a été déterminé au démoulage (20h) à partir du protocole décrit par Salaün (2005).

À partir de ce protocole, un indice de pouvoir tampon dB/dpH a été calculé dans un intervalle de pH donné, selon la formule de Van Slyke (1922). Cet indice exprime la différence de pH généré par le volume d'acide ou de base ajouté :

$$\frac{dB}{dpH} = \frac{(volume\ de\ base\ ou\ d'acide\ ajouté) \times (normalité)}{(volume\ de\ l'échantillon) \times (modification\ de\ pH)}$$

Les valeurs du rapport dB/dpH ont été étudiées sur des intervalles de pH correspondant au pouvoir tampon de composants du caillé et décrits par Salaün (2005).

4.2.1.8 Activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau (a_w) a été mesurée selon la norme ISO 18787 (2017).

4.2.1.9 Teneur en sel (NaCl)

La détermination de la teneur en NaCl a été réalisée par titrage coulométrique des ions chlorures contenus dans l'échantillon avec le chloruremètre Chloride Analyzer Model 926 (Sherwood Scientific, Cambridge, Royaume-Uni) suivant la norme NF V 04-289 (1978).

4.2.2 Activités protéolytiques et fractions azotées

4.2.2.1 Activité plasmine/plasminogène

Les activités plasmine/plasminogène ont été mesurées dans le lait en fin de maturation et dans le fromage au démoulage.

Préparation des échantillons de lait : ajout d'un tampon tri-sodium citrate (0,5 mL) dans l'échantillon (1,5 g) pour dissocier la plasmine et le plasminogène qui se solubilisent. L'échantillon est ensuite centrifugé 30 min à 20 800 g à 4 °C.

Préparation des échantillons de fromage : Dispersion de l'échantillon (2,5 g) dans du tri-sodium citrate (10 mL) à l'Ultra-turrax puis centrifugation 30 min à 20 800 g à 4 °C.

Pour chaque échantillon, le surnageant est déposé dans deux puits d'une micro-plaque et de l'urokinase est ajoutée dans le 2^e puit, dans lequel le plasminogène sera activé. La plaque est incubée 15 min à 37 °C puis un peptide synthétique, le pNAPEP 1703 (pyroGlu-Phe-Lys-pNA, HCl), qui est spécifique de la plasmine est ajouté dans les deux puits. Le peptide est hydrolysé par la plasmine et du p-nitroaniline est libéré, dont l'intensité de la coloration jaune est suivie

(densité optique, DO) à 450 nm pendant 2 h. Dans le premier puit, l'activité de la plasmine seule est suivie et dans le deuxième puit, l'activité de la plasmine + du plasminogène activé est suivie. L'activité potentielle de la plasmine liée au plasminogène est déterminée par la différence entre les deux puits.

L'activité est mesurée avec la pente de la DO en fonction du temps entre 40 et 60 min pour l'activité plasmine et entre 15 et 35 min pour l'activité plasmine + plasminogène, qui sont les portions linéaires des cinétiques. La pente est corrigée par un « blanc » composé du tampon tri-sodium citrate, d'eau et du peptide synthétique pour l'activité plasmine et du tampon tri-sodium citrate, d'urokinase et du peptide synthétique pour l'activité plasmine + plasminogène. L'activité est exprimée en DO/min.

4.2.2.2 Activité des protéases acides (aspartiques)

La mesure de l'activité des protéases acides est basée sur la méthode de Hurley *et al.*, (1999) et a été réalisée dans les fromages au démoulage. Un peptide synthétique (Pro₁-Thr₂-Glu₃-Phe₄-[NO₂-Phe₅]-Arg₆-Leu₇) est mis en contact de l'échantillon préalablement dispersé dans un tampon citrate à pH 6,5 pendant 2 h à 37 °C. L'activité enzymatique est ensuite arrêtée en exposant l'échantillon à une température de 70 °C pendant 10 min. L'hydrolyse du peptide synthétique par les protéases acides libère un peptide [NO₂-Phe₅]-Arg₆-Leu₇. Cette hydrolyse est réalisée par la chymosine et la pepsine mais pas par la chymotrypsine.

Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie liquide en phase inverse sur colonne Zorbax 300SB-C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 µ) dans un gradient composé 1) d'acide trifluoroacétique (0,1 %) et 2) d'un mélange d'acide trifluoroacétique (0,1 %) et d'acétonitrile pur (85/15). Les peptides séparés sont détectés en sortie de colonne à 270 nm par un détecteur à barrette de diodes Ultimate 3000 DAD.

L'activité des protéases acides a été quantifiée par rapport à une gamme de calibration couvrant une activité entre 0,002 et 2 IMCU/mL, réalisée avec le coagulant CHY-MAX Plus (Ch. Hansen) utilisé pour les fabrications DELAC.

4.2.2.3 Fractions azotées

Les dosages des fractions azotées dans le lait, le lactosérum, le caillé et le fromage ont été réalisés selon les normes présentées dans le Tableau 17.

Tableau 14 : Références des normes de dosages des fractions azotées (NT, NS, NPN) dans le lait, le lactosérum, le caillé et le fromage.

Fractions azotées	Matrice	Norme
Azote total (NT)	Lait et lactosérum	ISO 8968-4 (2001)
	Caillé et fromage	ISO 27871 (2011)
Azote soluble (NS)	Lait	ISO 17997-1 (2004)
	Fromage	ISO 27871 (2011)
Azote non-protéique (NPN)	Lait	ISO 8968-4 (2001)
	Fromage	ISO 27871 (2011)

Des indices ont été calculés à partir des résultats des fractions azotées :

- Indice de protéolyse primaire = NS/NT
- Indice de protéolyse secondaire = NPN/NT
- Part de la protéolyse secondaire sur la protéolyse primaire = NPN/NS
- Matière Azotée Totale (MAT) = $NT \times 6,38$
- Matière Azotée Protéique (MAP) = $(NT - NPN) \times 6,38$

4.2.2.4 Profil peptidique

Les profils peptidiques ont été mesurés sur fromage affiné (60 jours). Le principe est de séparer les substances du fromage par degré d'hydrophobicité croissante et de détecter les molécules séparées à 214 nm, longueur d'onde absorbée spécifiquement par les liaisons peptidiques.

Les échantillons de fromage ont été dispersés à l'Ultra-turrax dans l'eau ultrapure. Ils ont ensuite subi deux traitements différents : 1) Une filtration à 0,2 μm , laissant passer tous les peptides et 2) une ultrafiltration à 3 kDa pour enlever les gros peptides (issus de la protéolyse primaire) et laisser passer les petits peptides (issus de la protéolyse secondaire).

Les peptides des deux types d'échantillon ont été séparés par chromatographie liquide en phase inverse (Dionex) sur colonne Zorbax 300SB-C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 μ) précédée d'une pré-colonne Zorbax 300 SB-C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 μ). Les échantillons ont été élués dans un gradient composé 1) d'acide trifluoroacétique (0,1 %) et 2) d'un mélange d'acide trifluoroacétique (0,1 %) et d'acétonitrile (60/40). Les peptides ont été détectés en sortie de colonne à 214 nm par un détecteur à barrette de diodes Ultimate 3000 DAD.

Les chromatogrammes ont été divisés en quatorze zones à la suite d'un pré-essai, dont l'aire des pics est susceptible de changer entre deux types de traitement (filtration 0,2 µm ou filtration 3 kDa).

4.2.2.5 Fractions caséiques

Les fractions caséiques ont été quantifiées en fin d'affinage suivant la procédure décrite par Miranda *et al.* (2020).

4.2.3 Microbiologie

4.2.3.1 Suivi analytique

Les analyses microbiologiques ont été réalisées par dénombrement selon les protocoles présentés dans le Tableau 15. Pour les échantillons de caillé et de fromage, 10 g ont été pesés, auxquels ont été ajoutés 90 g de solution de citrate de trisodium dihydraté (2%), puis le tout a été broyé au stomacher pendant 2x5 min pour créer la solution mère. Les milieux gélosés ont étéensemencés à la surface avec 50 µL de solution à l'aide d'un ensemenceur SPIRAL (Don Whitley Scientific).

Les spores butyriques ont été dénombrées en milieu liquide avec la méthode du « Nombre le Plus Probable ». Chaque solution mère a été diluée en cascade jusqu'au 1/100 puis les tubes ont été scellés hermétiquement avec de la paraffine. Les tubes ont été chauffés à 75 °C pendant 15 min pour détruire les formes végétatives et activer les spores. Après refroidissement, les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 7 jours.

Tableau 15 : Protocoles d'analyses microbiologiques.

Population recherchée	Milieu de culture	Conditions d'incubation	Référence
Flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR)	Plate Count Agar (PCA, Biokar Diagnostics, France)	3 jours à 30°C, aérobiose	NF V 08-011 (1978)
Coliformes	Violet Red Bile Agar (VRBA, Difco BD, Detroit, USA)	24 heures à 30°C, aérobiose	NF V 08-054 (1999)
Lactocoques	Medium 17 lactosé (gélose M17)	2 jours à 20°C, aérobiose	Terzaghi & Sandine (1975)
Leuconostocs	Mayeux, Sandine et Elliker (MSE, Biokar Diagnostics, France)	3 à 5 jours à 25°C, aérobiose	Mayeux <i>et al.</i> (1962)
Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LBHF)	Facultativ Heterofermentativen (milieu gélosé FH)	3 jours à 37°C, anaérobiose	Isolini <i>et al.</i> (1990)
Spoires butyriques	Bouillon de Bryant et Burkey modifié Bergère avec résazurine	7 jours à 37°C	Recommandations du CNERMA (1986)

4.2.3.2 Analyses des bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes ont été recherchées dans les fromages affinés destinés à la dégustation pour confirmer leur comestibilité. Les méthodes utilisées sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Analyses et méthodes de recherches de bactéries pathogènes dans le fromage affiné.

Analyse	Référence
Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	AFNOR BKR 23/02-11/02
Recherche de <i>Salmonella</i>	AFNOR BIO 12/16-09/05
Dénombrement <i>Escherichia coli</i> à 44 °C	NF ISO 16649-2
Dénombrement Staphylocoques à coagulase positive à 37 °C	NF EN ISO 6888-2

4.2.3.3 Analyse microbiologique de l'eau

L'eau utilisée pour le dé lactosage a été analysée en microbiologie pour confirmer sa propreté à la consommation. Les méthodes utilisées sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Analyses et méthodes de recherches de bactéries dans l'eau du réseau.

Analyse	Référence
Microorganismes revivifiables à 36°C	NF EN ISO 6222
Microorganismes revivifiables à 22°C	NF EN ISO 6222
Coliformes totaux	NF EN ISO 9308-1
<i>Escherichia coli</i>	NF EN ISO 9308-1
Enterocoques intestinaux	NF EN ISO 7899-2
Spores anaérobies sulfite-réducteurs	NF EN 26461-2

4.2.4 Cellules somatiques

Les cellules somatiques ont été dénombrées dans le lait à sa réception, par méthode fluoro-optoélectronique, suivant la norme ISO 13366-2 (2007).

4.2.5 Propriétés fonctionnelles

4.2.5.1 Propriétés fonctionnelles à température ambiante : propriétés rhéologiques

Les propriétés fonctionnelles à température ambiante des fromages ont été évaluées au travers de leurs propriétés rhéologiques. Celles-ci ont été mesurées par compression uniaxiale à vitesse constante (CUVC) selon la norme ISO-TS 17996 (2006) avec l'analyseur de texture TAX-T2 (Stable Micro Systems).

Quatre paramètres ont été mesurés :

- Le module de déformabilité (MD), qui traduit la rigidité de la matrice.
- La contrainte (Cf) et l'énergie (Wf) à la fracture qui traduisent la résistance mécanique de la matrice.
- La déformation à la fracture (Df) qui traduit la déformabilité de la matrice, c'est-à-dire la résistance de la matrice à une grande déformation.

4.2.5.2 Aptitudes culinaires

Les aptitudes culinaires des fromages ont été mesurées suivant des méthodes internes d'ACTALIA Produits Laitiers.

Étalement

Mesure de l'aptitude à l'étalement du fromage après sa fonte par le test de Schreiber. Les échantillons de fromage moulu (8 g +/-0,01 g) étaient transformés en palet de forme cylindrique en le pressant dans un moule pendant 2 minutes à 65 g/cm². Le palet était placé sur une feuille au centre d'une cible constituée de cercles concentriques espacés de 2mm et

de 6 rayons. Le dispositif était placé dans un four à chaleur tournante équilibré à 225 °C pendant 3 minutes. Le dispositif était ensuite refroidi à température ambiante pendant 2 minutes puis un coefficient d'étalement était mesuré grâce à la cible, définie par le rapport de la surface du fromage fondu sur la surface initiale du palet. La mesure était répétée trois fois par échantillon.

Incertitude absolue de la méthode : 0,1 (pas d'unité).

Exsudation d'huile

La matière grasse exsudée du fromage sous l'effet de la chaleur est appelée « huile ». Les échantillons de fromage moulu (3 g +/- 0,01 g) ont été pesés dans un godet de butyromètre à fromage qui a ensuite été inséré dans un butyromètre. Ce dernier a été placé dans un bain-Marie à 65 °C en position verticale pendant 20 minutes. Après chauffage, le butyromètre a été rempli d'eau distillée à 60 °C jusqu'à la graduation 35 % de la colonne du butyromètre. Il a ensuite été centrifugé à 1200 tours par minutes pendant 2 minutes. La quantité brute d'huile exsudée est mesurée par lecture de la colonne et exprimée en g/100g de fromage. La mesure est répétée deux fois par échantillon.

Incertitude absolue de la méthode : 0,5 g/100 g de fromage

Élasticité à chaud

L'élasticité à chaud du fromage déshuilé a été estimée par la mesure d'une force d'extrusion. Après la mesure de l'exsudation d'huile, le fromage fondu est récupéré et une force d'extrusion est mesurée avec un texturomètre INSA-ITFF. Les résultats sont exprimés en kilogramme force (kgF avec 1kgF = 10N).

Incertitude absolue de la méthode : 0,01 kgF (Kilogramme-Force, avec 1 kgF = 10 N).

Filant

La capacité du fromage à faire des fils a été estimée par la mesure de la longueur du dernier fil de fromage avec un filomètre : traction verticale d'un harpon mobile étirant le fromage dans une cuve thermostatée. Les échantillons de fromage moulu (17 g +/- 0,01 g) ont été pesés dans un bécher puis le harpon a été introduit dans la mouture sans tasser le fromage. Le bécher a été chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 10 minutes puis placé dans la cuve du filomètre à 60 °C pendant 5 minutes. Des fils de fromage sont créés par la traction du harpon dont la hauteur est mesurée lors de la rupture du dernier fil. Les résultats sont exprimés en millimètres (mm). La mesure est répétée trois fois par échantillon.

Incertitude absolue de la méthode : 1 mm.

Colorimétrie en conditions gratinantes

Mesure de la couleur du fromage bruni par chauffage au four. Les échantillons de fromage moulu (10 g +/- 0,01 g) sont répartis uniformément dans un moule à revêtement téflon de 8 cm de diamètre. Le moule est chauffé à 225 °C au four à chaleur tournante pendant 6 min 30 s. Le disque de fromage formé est démoulé sur un support de lecture blanc en faïence et laissé à refroidir pendant 2 minutes. La couleur du disque est mesurée avec un chromamètre sur 5 points : 1 mesure centrale et 4 mesures périphériques diamétralement opposées. La mesure est répétée trois fois.

Les résultats sont exprimés en coordonnées L^* , a^* et b^* dans l'espace de couleur en trois dimensions créées par la CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) (Figure 24).

- L'axe L^* est vertical exprime la clarté (de 0 à 100 : 0 = terne et 100 = vif). Incertitude absolue : 0,01 u.a (unité arbitraire).
- L'axe a^* est l'axe horizontal vert-rouge (de -60 à 60 : -60 = vert, 60=rouge). Incertitude absolue : 0,01 u.a.
- L'axe b^* est l'axe horizontal bleu-jaune (de -60 à 60 : -60 = bleu, 60 = jaune). Incertitude absolue : 0,01 u.a.

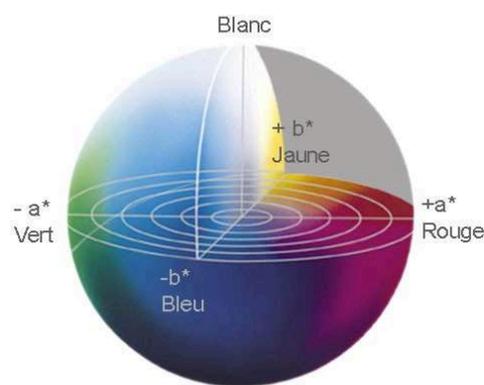


Figure 24 : Espace colorimétrique CIE, coordonnées Lab.

4.2.6 Analyses sensorielles

Les propriétés sensorielles des fromages affinés ont été évaluées avec un panel de 12 juges formés selon la norme ISO 8586 (2012). Les dégustations se sont déroulées dans un laboratoire de dégustation conforme à la norme ISO 8589 (2010). Le panel formé a été entraîné avant le déploiement des expérimentations fromagères avec des fromages issus de fabrication-essais de même trajectoire technologique que celle utilisée pour les expérimentations fromagères.

Les fromages fabriqués lors des expérimentations fromagères étaient analysés deux fois par semaine, dans deux conditions de dégustation. À chaud, c'est-à-dire chauffé dans un poêlon à Raclette de manière à ce que des bulles apparaissent autour de la tranche de fromage et que celle-ci soit fondue sans être grillée, et à température ambiante (15-17 °C). Les descripteurs évalués sont présentés dans le Tableau 18 et ont été notés sur une échelle de 0 à 10.

Tableau 18 : Descripteurs sensoriels des fromages affinés dégustés à chaud et à température ambiante.

	Analyses à température ambiante	Analyses à chaud
Texture	Fermeté Élasticité Texture sèche Collant	Déphasage Fermeté Filant Texture caoutchouteuse Fondant Texture grasse Granuleux en bouche
Arômes/saveurs/goûts	Intensité globale Salé Acide Amer Goût piquant Arôme lacté Arôme animal Persistance du goût	

4.2.7 Microstructure

La microstructure du fromage a été analysée au 5^e jour d'affinage et en fin d'affinage par microscopie confocale à balayage laser.

Les échantillons ont été découpés au scalpel en fines tranches de 5 x 5 x 2,5 mm. Le réseau protéique a été marqué avec 50 µL d'Acridine Orange à 0,1 % (Thermofisher Scientific) et la matière grasse avec 25 µL de Rouge Nil à 0,002 % (Sigma Aldrich). La coloration est réalisée à 4 °C pendant 45 min. L'Acridine Orange et le Rouge Nil sont excités à 488 et 552 nm, respectivement et émettent à 494 nm-546 nm pour l'Acridine Orange et 573 nm – 743 nm pour le Rouge Nil.

L'analyse est réalisée avec un microscope Leica SP8 inversé et un objectif HC PL APO CS 40x/1,25 à immersion dans l'huile. Les images réalisées ont une résolution de 1024x1024 pixels et mesurent 290,62 x 290,62 µm. Le réseau protéique est représenté en vert et la matière grasse est représentée en rouge.

Chapitre 3

Résultats et discussions

1 Mise au point de l'échantillonnage en cuve

1.1 Introduction

L'objectif de cette phase de mise au point méthodologique est de répondre à plusieurs problématiques liées à l'échantillonnage en cuve afin d'établir un protocole d'échantillonnage qui sera utilisé lors du déploiement des expérimentations fromagères.

Comment prélever le caillé en cuve et le stabiliser afin de préserver sa composition du moment du prélèvement et afin de l'analyser de manière reproductible ?

Une réponse a été apportée par une série d'expériences organisée en 3 volets :

- Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ? Dans un premier temps, le temps de tamisage a été déterminé par l'étude du débit et de l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant à travers le tamis pendant le tamisage du mélange caillé-lactosérum. Dans un deuxième temps, plusieurs volumes de prélèvement ont été testés afin d'obtenir une séparation du caillé et du lactosérum similaire des échantillons prélevés avant et après délactosage.
- Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner le caillé tamisé ? Deux méthodes ont été comparées : le sous-échantillonnage du caillé non broyé immédiatement après le tamisage et le sous-échantillonnage du caillé mixé. Ce volet est consacré en grande partie à l'optimisation de l'étape de mixage du caillé tamisé.
- Volet 3 : Comment prélever le mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement ? Ce volet présente les expériences et les décisions ayant permis de formaliser le prélèvement du mélange caillé-lactosérum.

À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?

Nous avons répondu à cette question en analysant l'évolution de la concentration en lactose, utilisée comme marqueur d'équilibrage des solutés entre LIG et LEG, dans le lactosérum de la cuve au cours de la fabrication.

1.2 Volet 1 : Quel temps de tamisage et quels volumes de prélèvement permettent une séparation reproductible du caillé et du LEG ?

1.2.1 Objectif 1 : détermination d'un temps de tamisage pour la séparation du caillé et du lactosérum

Le temps de tamisage doit être formalisé pour réaliser une séparation similaire de tous les échantillons de caillé-lactosérum. La synérèse du caillé prélevé en cuve ne pouvant être interrompue, le temps de tamisage ne peut pas être basé sur le temps nécessaire à un arrêt total de l'écoulement. La détermination d'un temps de tamisage pertinent ne peut donc être fondé que sur la nature du lactosérum en train de s'écouler. Nous souhaitons donc savoir à quel moment au cours du tamisage le LEG dans lequel le caillé est en suspension s'est évacué en majorité.

Nous sommes partis d'un postulat : Le LEG, qui est libre, s'écoulerait du tamis plus rapidement que le LIG, qui est retenu par le réseau protéique du caillé. Si les deux phases aqueuses présentent des concentrations en solutés différentes, ce postulat peut être confirmé en analysant l'évolution de la composition du lactosérum s'écoulant du tamis. En effet, une concentration caractéristique du LEG pourrait être observée au début du tamisage tandis qu'une concentration s'approchant de celle du LIG pourrait être observée en fin de tamisage.

Nous avons tenté de vérifier ce postulat avec deux études :

- 1) L'étude du débit d'écoulement du lactosérum pendant le tamisage
- 2) L'étude de l'évolution de la teneur en lactose du lactosérum pendant le tamisage

1.2.1.1 Étude du débit d'écoulement du lactosérum pendant le tamisage du caillé

L'échantillon de caillé-lactosérum a été prélevé en cuve au pichet et a été versé immédiatement dans le tamis. Au moment du versement, une grande partie du lactosérum du mélange caillé-lactosérum s'est écoulé en premier et est passé au travers du tamis tandis que le caillé se déverse dans le tamis dans un second temps. Lorsque l'échantillon s'est complètement déversé dans le tamis, le caillé s'agglomère au fond du tamis en formant une masse retenant du lactosérum. Après la fin du versement du mélange caillé-lactosérum dans le tamis, les grains de caillé étaient visiblement en suspension dans du lactosérum peinant à s'écouler, suggérant que le tamisage devait être poursuivi. Ainsi, nous nous sommes concentrés sur l'étude du débit d'écoulement du lactosérum retenu dans le tamis par le caillé

aggloméré. Le début du versement de l'échantillon correspondant à t_0 , l'étude de l'écoulement du lactosérum a débuté à 10 s, c'est-à-dire au moment où la totalité du caillé est dans le tamis. Ainsi, la première valeur de débit est le point à 20 s, représentant la quantité de lactosérum écoulé entre 10 et 20 s.

La Figure 25 montre que le débit de lactosérum diminue fortement au début du tamisage (entre 20 et 60 s). Cette forte diminution de débit refléterait l'évacuation rapide du LEG libre qui serait presque entièrement évacué autour de 60 s. Aux alentours de 60 s, la diminution du débit ralentit et semble atteindre une constance. Les faibles valeurs de débit après 60 s refléteraient l'écoulement d'un lactosérum constitué majoritairement de LIG, induit par la synérèse et la compression du caillé sous son propre poids.

Des dynamiques d'écoulement différentes sont visibles entre les échantillons prélevés avant et après délactosage et entre les échantillons de 1 L et de 3 L (Figure 25). Les échantillons prélevés après délactosage ont globalement un débit plus faible et atteignent un débit constant plus rapidement que ceux prélevés avant délactosage. De la même façon, les débits sont plus faibles lors du tamisage des échantillons de 1 L que ceux des échantillons de 3 L et atteignent un débit constant plus rapidement.

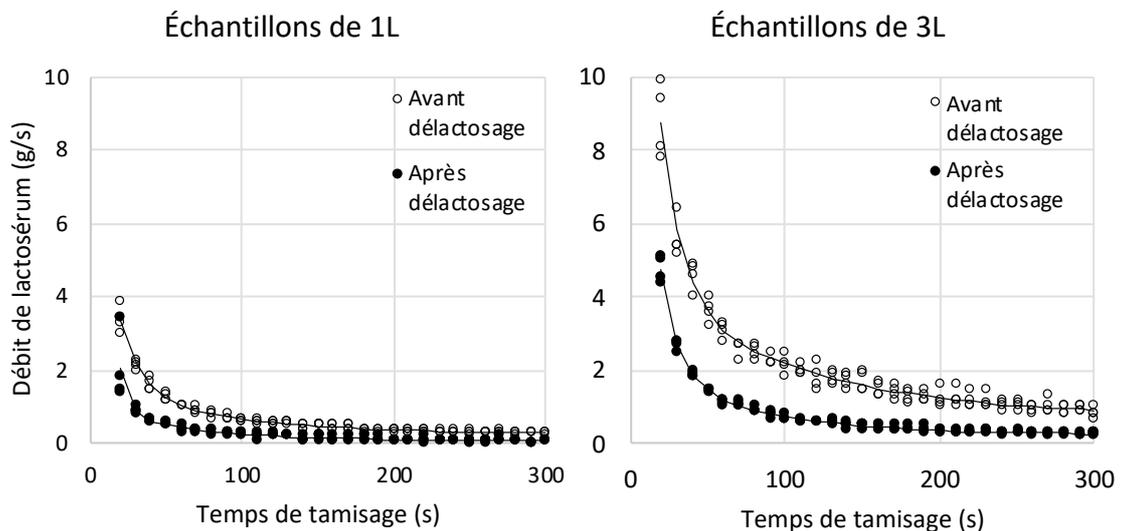


Figure 25 : Évolutions du débit de lactosérum s'écoulant du tamis en fonction du temps au cours du tamisage d'échantillons de 1 L et 3 L prélevés avant (n=4) et après délactosage (n=4) (délactosage : E+39%).

La différence de dynamique d'écoulement observée entre les échantillons prélevés avant et après délactosage pour un même volume s'explique par des différences de quantité de caillé tamisé. Plus la proportion de caillé dans le mélange caillé-lactosérum est grande, plus l'évacuation du lactosérum est obstruée. Dans les échantillons prélevés après délactosage, la dilution de la cuve a entraîné une diminution de la proportion de caillé par rapport au lactosérum.

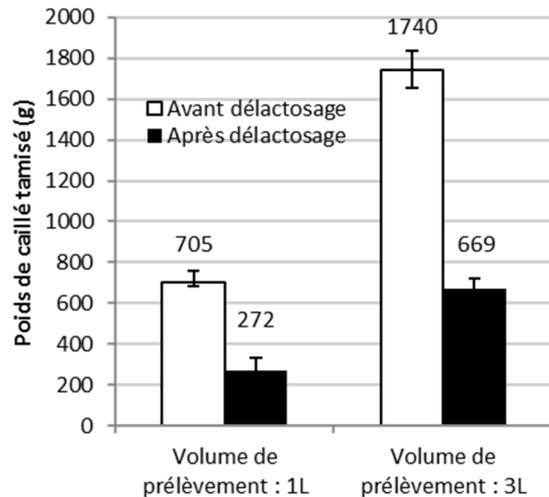


Figure 26 : Quantités de caillé obtenues après 60 s de tamisage (n=4 pour chaque modalité) (délactosage E+39%).

L'évacuation du lactosérum a donc été moins obstruée : le débit de lactosérum observé à partir de 20 s est plus faible car moins de lactosérum est resté dans le tamis, piégé par le caillé. La quantité de caillé tamisé crée également une différence de débit d'écoulement du lactosérum entre les échantillons de 1 L et les échantillons de 3 L. Plus la quantité de caillé tamisé est grande, plus le tamis est colmaté et plus la quantité de lactosérum retenue est grande, augmentant ainsi son débit d'écoulement observé à partir de 20 s. La Figure 26 illustre les différences de quantité de caillé dans le tamis au bout de 60 s de tamisage.

La rétention du LEG par la masse de caillé aggloméré dans le tamis suggère que la séparation du caillé et du lactosérum dépend de la quantité de caillé tamisé. Une rétention plus importante pourrait entraîner un mélange du LEG retenu avec le LIG qui s'exsude du caillé et cela pourrait créer un biais dans l'étude de la composition du caillé si leurs compositions sont différentes. Afin d'éviter ce biais, les échantillons de caillé destinés à être comparés doivent être tamisés dans les mêmes conditions c'est-à-dire avec des quantités de caillé les plus proches possibles.

La Figure 26 montre que les échantillons de 1 L avant délactosage et 3 L après délactosage permettent d'obtenir des quantités de caillé similaires et la Figure 27 montre que ces échantillons ont également des dynamiques d'écoulement similaires. La quantité de caillé tamisé semble donc être un paramètre important pour parvenir à tamiser les échantillons de caillé-lactosérum dans des conditions similaires. Ainsi, dans la perspective de comparer la

composition de caillés prélevés avant et après délactosage, la quantité de caillé tamisé doit être ajustée pour éviter des biais liés au tamisage.

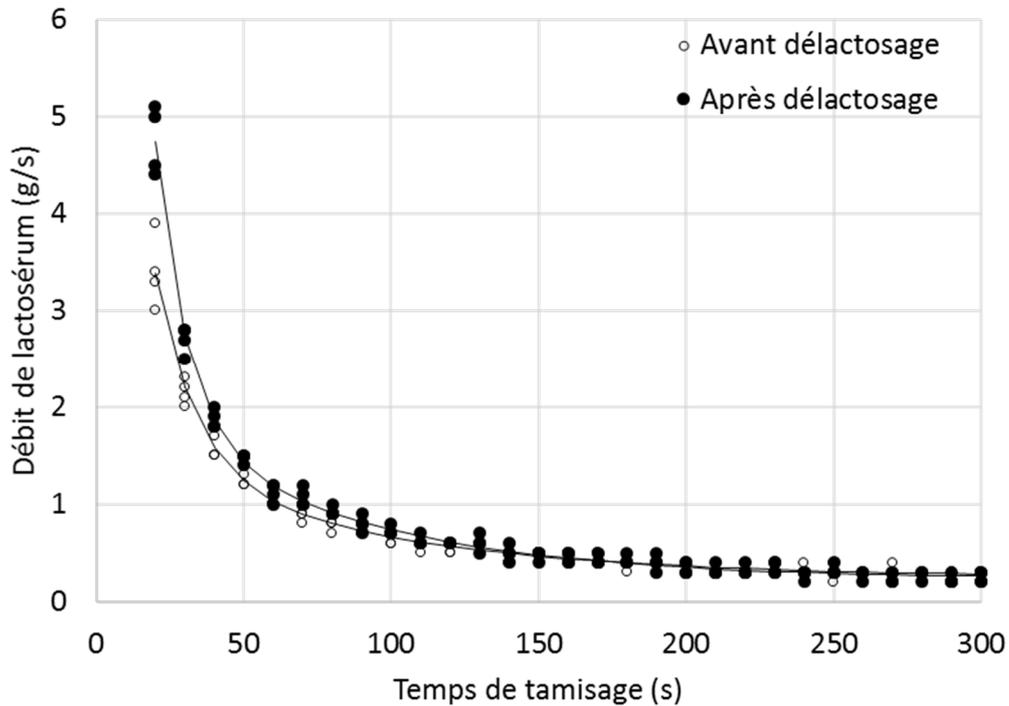


Figure 27 : Évolutions du débit de lactosérum s'écoulant du tamis en fonction du temps au cours du tamisage d'échantillons de 1 L avant délactosage (n=4) et 3 L après délactosage (n=4) (délactosage E+39%).

Une durée de tamisage a été estimée à partir des mesures de débits (1 L avant délactosage et 3 L après délactosage). Cette durée de tamisage permettant de différencier au mieux LEG et caillé + LIG correspondrait à un point de transition entre la diminution rapide du débit en début de tamisage et la diminution lente en fin de tamisage. Nous avons donc modélisé les phases de diminution rapide et de diminution lente du débit avec un maximum de points permettant la linéarité de chaque modèle afin de déterminer un point de transition (Figure 28). Nous avons considéré que l'intersection des deux modèles est la meilleure estimation du point de transition entre les deux phases, qui correspondrait au temps de tamisage permettant la séparation du caillé + LIG et du LEG. Avec 1 L avant délactosage, le point de transition se situe à 60,2 s et avec 3 L après délactosage, ce point se situe à 58,9 s. À partir de ces résultats, et en considérant que la phase rapide d'écoulement peut être attribuée au seul LEG et la phase lente au seul LIG, un temps de tamisage de 60 s serait nécessaire pour évacuer une majorité de LEG tout en conservant au maximum le LIG dans l'échantillon.

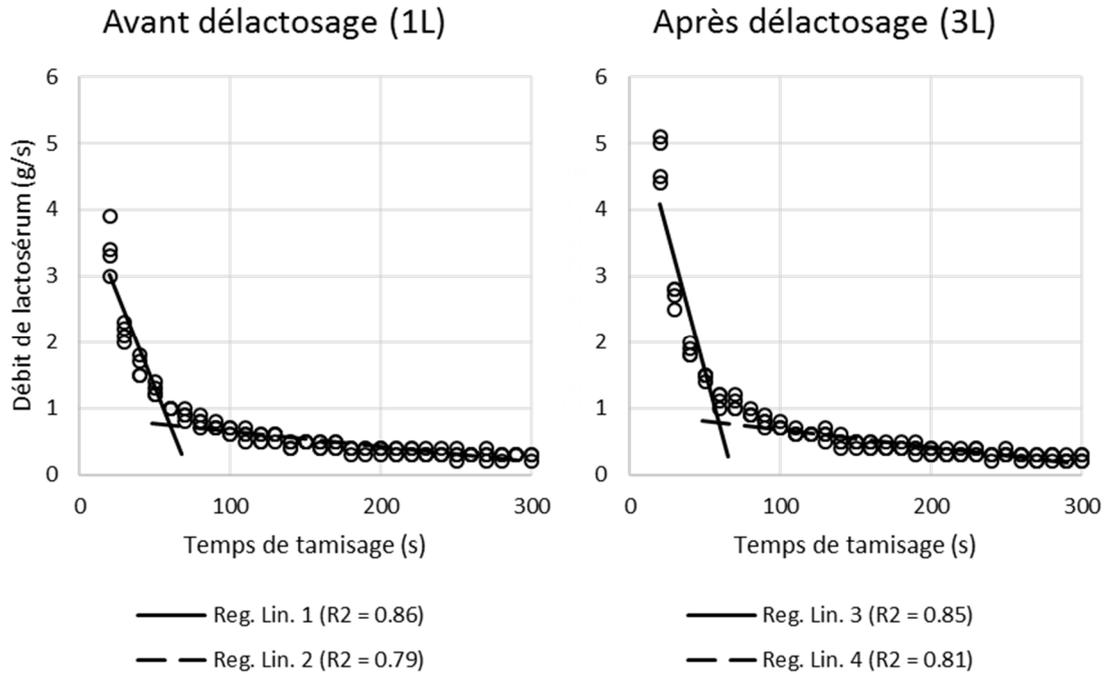


Figure 28 : Modélisation de la chute et de la stabilisation du débit de lactosérum au cours du tamisage d'échantillons de 1 L prélevé avant délactosage et de 3 L prélevés après délactosage (délactosage E+39%).

Pour évaluer la reproductibilité de la séparation, la diminution du débit et la stabilisation du débit ont été modélisées sur les 8 mesures (4 avant délactosage et 4 après délactosage) et la variation du temps de tamisage déterminée sur chacune des cinétiques a été caractérisée (Tableau 19).

Tableau 19 : Coefficient de détermination, significativité et intersection des modèles linéaires des phases de diminution rapide (R) et de diminution lente (L) du débit de lactosérum lors du tamisage des échantillons prélevés avant et après délactosage.

Échantillon	Phase	Avant délactosage (1 L)			Après délactosage (3 L)		
		R ²	p-value	intersection	R ²	p-value	intersection
1	R	0,91	0,010	61,4	0,83	0,031	59,4
	L	0,77	< 0,001				
2	R	0,86	0,023	60,7	0,84	0,027	59,6
	L	0,77	< 0,001				
3	R	0,92	0,011	60,7	0,91	0,013	59,2
	L	0,84	< 0,001				
4	R	0,89	0,017	58,6	0,85	0,027	58,6
	L	0,85	< 0,001				
Moyenne				60,4		59,2	
Variation (%)				2,01		0,70	

Dans cette expérience, les échantillons ont été prélevés lors de fabrications de Morbier à l'ENILBio qui ont été dé lactosées avec un protocole différent de ceux étudiés dans le projet DELAC. Les volumes de 1 L avant dé lactosage et 3 L après dé lactosage conviennent donc à l'échantillonnage dans ces conditions mais ne permettront pas d'obtenir des quantités de caillé similaires lors des fabrications DELAC. Il est donc nécessaire de déterminer quels volumes utiliser avant et après dé lactosage dans le contexte des fabrications DELAC afin d'ajuster la quantité de caillé tamisée. Cette détermination est l'objet de la partie 1.2.2 de ce chapitre.

1.2.1.2 Étude de l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis au cours de la séparation

Différents débits de lactosérum pendant le tamisage du mélange caillé-lactosérum ont été observés précédemment et associés au LEG (débit rapide) et au LIG (débit lent). Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé la composition en lactose de la phase aqueuse s'écoulant du tamis pendant le tamisage. Pour différencier les deux phases aqueuses, nous nous sommes servis de la dilution de la cuve pour le dé lactosage. Nous avons considéré que la dilution affecte le LEG dans un premier temps en faisant diminuer sa concentration en lactose et le LIG dans un deuxième temps lorsque les concentrations s'équilibrent entre les deux phases. En prélevant l'échantillon de caillé-lactosérum juste après la dilution, nous espérons obtenir un LEG dilué et un LIG avec une plus forte concentration en lactose.

Sur la Figure 29, la concentration en lactose du lactosérum des échantillons prélevés dans les cuves dé lactosées augmente rapidement entre 0 et 60 s de tamisage, passant de 25 g/kg à 35 g/kg. Après 60 s, l'augmentation ralentit et jusqu'à 300 s, la concentration en lactose a augmenté de 35 g/kg à 40 g/kg. En revanche, au cours du tamisage de l'échantillon prélevé dans la cuve non dé lactosée, la concentration en lactose n'évolue pas et reste proche de celle du lait (49 g/kg). Ainsi, le prélèvement des échantillons de caillé-lactosérum 30 s après la fin de la dilution de la cuve a permis d'obtenir une différence de concentration en lactose au sein de l'échantillon de caillé-lactosérum. Cette différence a conduit à l'identification du LEG et du LIG.

Au début du tamisage, la faible concentration en lactose reflète le LEG dilué tandis que la plus forte concentration en fin de tamisage reflète le LIG qui n'a pas eu le temps de s'équilibrer. La faible concentration en lactose du LIG des fabrications dé lactosées (40 g/kg) par rapport au

Non dél. (49 g/kg) montre que les concentrations en lactose ont commencé à s'équilibrer. Son augmentation rapide dans les fabrications délactosées traduit l'écoulement du LEG dilué : au fur et à mesure que le LEG s'évacue, la proportion de LIG dans le flux de lactosérum augmente, se traduisant par une augmentation de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis. Alors que la quantité de LEG dans le tamis s'épuise, l'augmentation de la concentration en lactose ralentit et tend à se stabiliser lorsque le flux de lactosérum est constitué en majorité de LIG.

Figure 29 : Évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis au cours du tamisage.

Deux vitesses d'évolution peuvent être identifiées : une évolution rapide entre 0 et 60 s et une évolution lente après 60 s de tamisage. Ces vitesses ont été modélisées par régression linéaire et un point de transition, correspondant à l'intersection des modèles a été calculé : 67,4 s. Ces 67 s peuvent être considérées comme une estimation du temps de tamisage nécessaire pour séparer le caillé + LIG et le LEG.

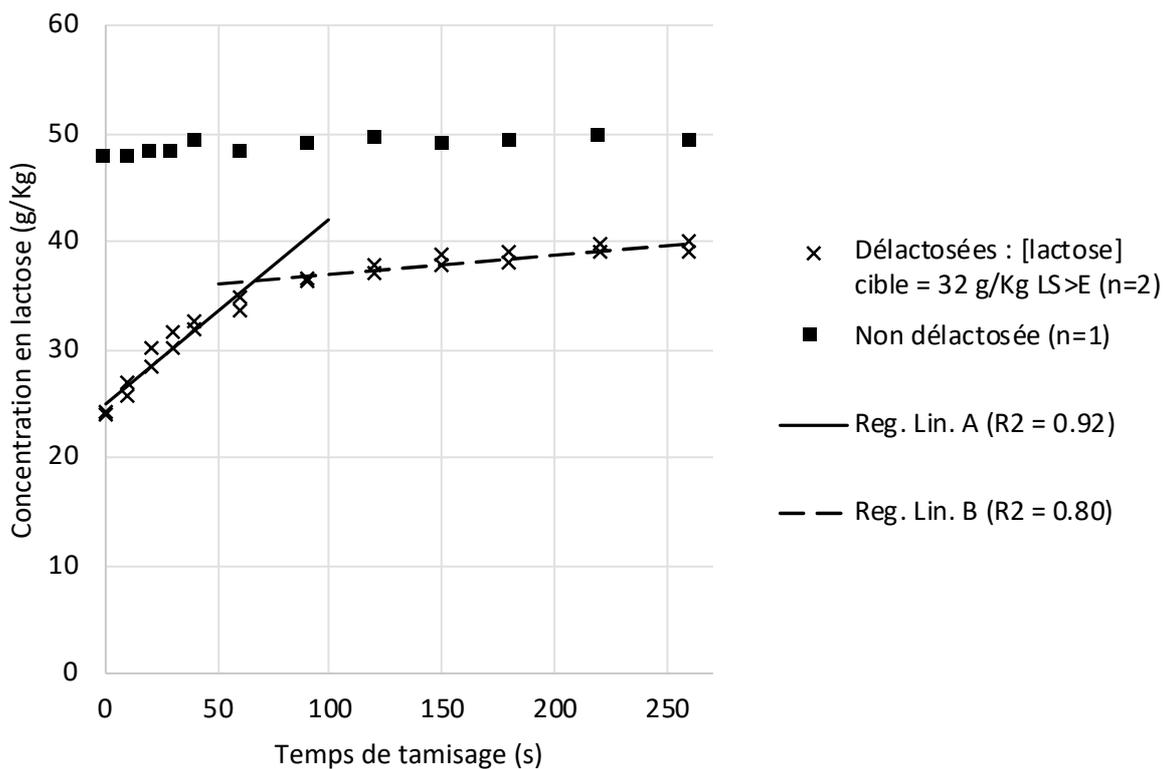


Figure 29 : Évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis au cours du tamisage

1.2.1.3 Conclusion sur la séparation du caillé et du lactosérum

Le prélèvement du mélange caillé-lactosérum proche de la dilution a permis d'observer une différence de concentration en lactose entre LEG et LIG. Cette différence confirme que le réseau protéique du caillé sépare les deux compartiments aqueux : sans cette séparation, la totalité du lactosérum aurait été diluée et la concentration en lactose serait homogène tout au long du tamisage. Nous avons donc réussi à discriminer LEG et LIG pendant le tamisage. Les évolutions du débit et de la teneur en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis ont toutes deux présenté un changement de vitesse à des moments proches (60 s et 67 s). Cette similarité suggère que l'évolution de la teneur en lactose est liée à la différence de vitesse d'écoulement entre les deux phases et à l'épuisement de la phase diluée. Nous pouvons conclure que LEG et LIG ont des vitesses d'écoulement différentes au cours du tamisage et cette différence nous permet de les séparer par cette méthode.

La séparation par tamisage ne permet pas de séparer entièrement le caillé et son LIG du LEG car la synérèse entraîne un mélange des phases aqueuses durant tout le processus. Cependant, les points de transition entre les changements dynamiques présentent un compromis permettant d'éviter au maximum de retenir du LEG et de perdre du LIG. Pour l'échantillonnage au cours du plan expérimental, un temps intermédiaire et pratique de 65 s a été utilisé.

1.2.2 Objectif 2 : détermination du volume de prélèvement du mélange caillé-lactosérum

L'ajustement des volumes de prélèvement est nécessaire pour garantir une séparation similaire du caillé et du lactosérum de tous les échantillons de mélange caillé-lactosérum. Le choix des volumes de prélèvement avant et après délactosage a été fait selon trois critères :

- 1) La quantité de caillé récupérée dans le tamis :
 - Au moins 400 g de caillé est nécessaire pour les analyses.
 - Une quantité de caillé trop importante (>1000 g) rendrait l'homogénéisation du caillé techniquement trop compliquée lors de l'étape de sous-échantillonnage.
- 2) La différence entre les quantités de caillé prélevées avant délactosage et après délactosage doit être la plus faible possible.

3) L'impact du changement de volume de prélèvement sur la composition du caillé qui a été évalué avec l'ES du caillé (comparaison entre 1 L et 2 L avant dé lactosage et entre 2 L ou 3 L après dé lactosage).

Pour une raison pratique, un seul volume de prélèvement avant dé lactosage et un seul volume de prélèvement après dé lactosage doivent être déterminés pour toutes les modalités de dé lactosage.

1.2.2.1 Quantités de caillé

Tous les volumes testés permettent d'obtenir une quantité de caillé supérieure à 400 g, qui est la quantité minimale nécessaire pour les analyses (Figure 30). En revanche, les volumes de 2 L avant dé lactosage et 3 L après dé lactosage permettent de récupérer des quantités de caillé supérieures à 1000 g.

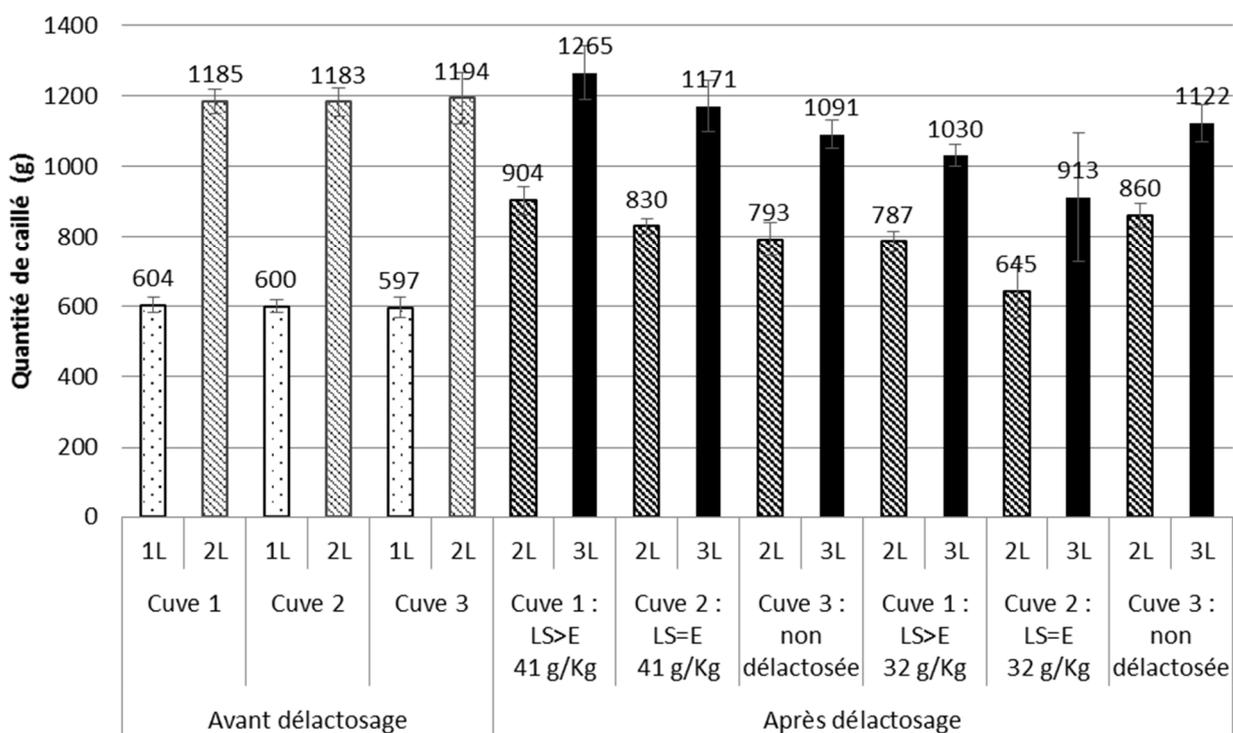


Figure 30 : Quantités moyennes de caillé obtenues après tamisage (60 s) en fonction de la modalité de dé lactosage, du volume et du stade de prélèvement (n=5).

1.2.2.2 Quantités similaires de caillé entre les prélèvements avant et après dé lactosage

L'objectif de cette expérience est de déterminer, pour chaque modalité de dé lactosage et dans les conditions du plan expérimental, quels volumes permettent d'obtenir les quantités de caillé les plus proches possibles avant et après dé lactosage. Avec les volumes testés, quatre

combinaisons sont possibles (Figure 31). Pour chaque combinaison, les écarts moyens de quantité de caillé récupéré entre les deux stades de prélèvement ont été calculés pour les comparer. Prélever 2 L avant dé lactosage et 3 L après dé lactosage génère l'écart moyen le plus bas : 115 g de différence de quantité de caillé. Cependant, la quantité totale de caillé obtenue avec ces volumes est supérieure à 1000 g (Figure 31). Le prélèvement de 1 L avant dé lactosage et 2 L après dé lactosage peut être un compromis, générant un écart moyen de caillé obtenu plus élevé (200 g), mais diminuant la quantité de caillé soustrait à la cuve : entre 600 et 800 g (Figure 31).

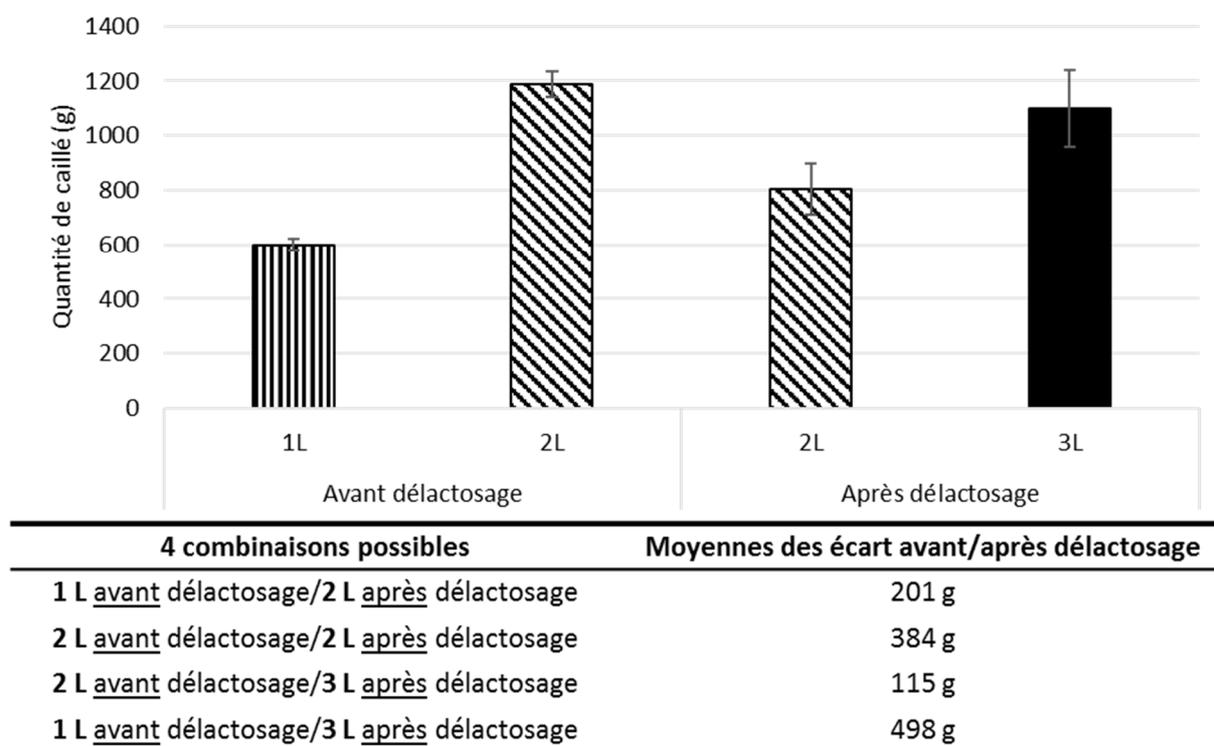
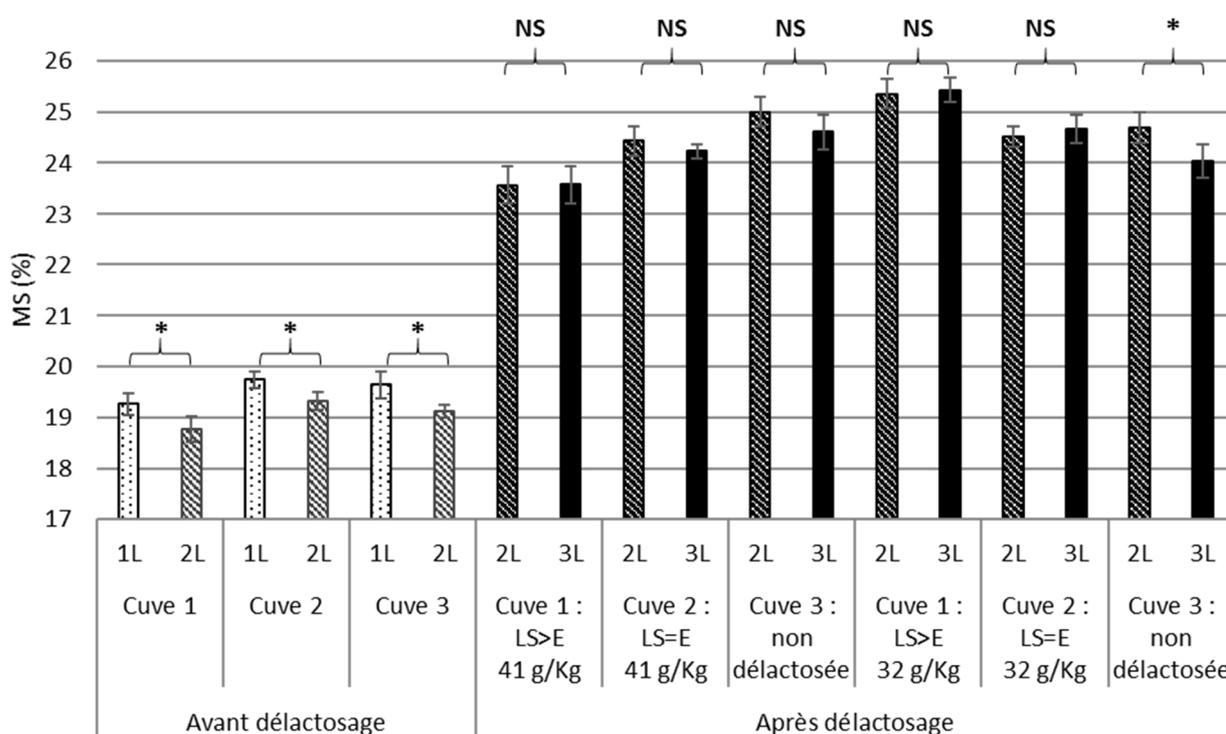


Figure 31 : Quantités moyennes de caillé obtenues après tamisage (60 s) en fonction du volume et du stade de prélèvement (n=5). Tableau : Écarts moyens de quantités de caillé obtenues entre les échantillons prélevés avant et après dé lactosage pour chaque combinaison.

1.2.2.3 Impact du changement de volume de prélèvement sur le tamisage

La teneur en MS du caillé a été mesurée et utilisée pour évaluer les différences d'écoulement du lactosérum au cours du tamisage entre 1 L et 2 L avant dé lactosage et entre 2 L et 3 L après dé lactosage. La teneur en MS n'a pas été utilisée pour comparer le tamisage entre des échantillons prélevés avant et après dé lactosage car l'égouttage du caillé avec le dé lactosage et le chauffage de la cuve crée une différence de teneur en MS plus importante que le tamisage.

Sur la Figure 32, les différences de teneur en MS sont systématiquement significatives entre les volumes de 1 L et de 2 L avant dé lactosage : le caillé prélevé avec 1 L est plus sec que le caillé prélevé avec 2 L. En revanche, après dé lactosage, les différences entre 2 L et 3 L ne sont pas significatives dans la majorité des cas. Les différences de teneur en MS du caillé par rapport au volume s'explique par la différence de quantité de caillé tamisée. Par exemple, la quantité de caillé est doublée avec le volume de 2 L (1200 g) par rapport au volume de 1 L (600 g) (Figure 32). Une plus grande quantité de caillé tamisée génère un encombrement du tamis plus important qui retient l'écoulement du lactosérum et diminue la teneur en MS du caillé. Nous sommes partis du principe qu'un écoulement moins entravé permet une meilleure séparation du LEG et du LIG. Ainsi, c'est en prélevant 1 L avant dé lactosage et 2 L après



dé lactosage, que la teneur en MS obtenue du caillé sera la plus faible, reflétant un écoulement moins obstrué.

Figure 32 : Teneur en MS des échantillons de caillé tamisé en fonction de la modalité de dé lactosage, du stade et du volume de prélèvement (n=5) (différences significatives (*) et non significatives (N.S.) entre deux volumes de prélèvement avec p = 5 %).

1.2.2.4 Conclusion

Nous avons choisi d'utiliser des volumes de prélèvement de 1 L avant dé lactosage et de 2 L après dé lactosage car :

- 1) Ils permettent d'obtenir des quantités de caillé comprises entre 400 g et 1000 g.
- 2) La différence de quantité de caillé obtenue avec 1 L avant et 2 L après dé lactosage est minimale, tout en évitant de prélever des quantités trop importantes de caillé, par rapport au prélèvement de 2 L avant dé lactosage et 3 L après dé lactosage.
- 3) La quantité moindre de caillé obtenue avec les volumes de 1 L avant dé lactosage et 2 L après dé lactosage permet un tamisage plus efficace du tamis grâce à un encombrement moindre du tamis.

1.3 Volet 2 : Comment stabiliser et sous-échantillonner le caillé tamisé ?

Après le tamisage, la synérèse du caillé se poursuit et l'échantillon redevient rapidement hétérogène. Cependant, il est nécessaire de disposer d'échantillons de caillé homogènes et faciles à répartir en sous-échantillons. Le but des expériences suivantes a été de développer une méthode permettant d'homogénéiser et de stabiliser les échantillons de caillé.

L'efficacité de la méthode de sous-échantillonnage dépend de sa capacité à créer des sous-échantillons similaires du point de vue de la composition. Pour évaluer cette capacité, nous avons mesuré la teneur en MS de chaque sous-échantillon obtenu à partir de chaque méthode de sous-échantillonnage. Nous avons ensuite comparé l'écart maximal (en %) de teneur en MS entre les sous-échantillons provenant du même échantillon de caillé pour déterminer la méthode créant les sous-échantillons les plus proches.

Une première méthode a été testée mais écartée rapidement : le broyage du caillé au stomacher. Cette méthode entraînait le déphasage de la matière grasse et créait donc un biais pour l'analyse de la composition du caillé.

Deux autres méthodes ont été testées, dont l'investigation est présentée dans cette partie :

- Le mixage du caillé tamisé
- La répartition du caillé tamisé avec un répartiteur

1.3.1 Objectif 1 : choix d'un couple de mixage vitesse/durée

L'efficacité du mixage et donc de l'homogénéisation du caillé par mixage au Thermomix® dépend du couple vitesse de mixage/durée de mixage. Des premiers essais de mixage sur un grand nombre de couples vitesse/durée ont permis de sélectionner les couples les plus intéressants, selon les critères suivants :

- L'homogénéité, la granulométrie (déterminée visuellement)
- Une élévation limitée de la température durant le broyage : une élévation de la température globale de l'échantillon $> 5^{\circ}\text{C}$ pourrait traduire un échauffement mécanique de la matrice trop important et une possible modification des caractéristiques physico-chimiques de la matrice.

Les trois couples retenus pour être comparés dans cette expérience étaient :

- Vitesse 6 (3100 tours/min) – 2x30 s
- Vitesse 8 (5800 tours/min) – 2x20 s
- Vitesse 10 (10200 tours/min) – 2x10 s

La variation de la teneur en MS des 6 sous-échantillons obtenus après mixage avec trois couples vitesse/durée différents est présentée dans la Figure 33. Le couple vitesse 8 – 2x20 s génère la plus forte hétérogénéité de teneur en MS entre les sous-échantillons (0,6 %). L'hétérogénéité la plus faible est générée par les couples vitesse 6 – 2x30 s et vitesse 10 – 2x10 s (0,3 %). Nous ne pouvons pas expliquer la

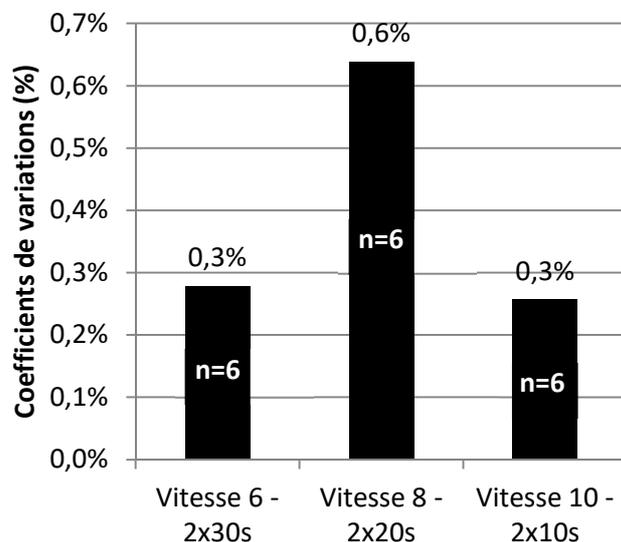


Figure 33 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés après mixage selon 3 couples vitesse/durée.

différence observée entre le couple vitesse 8 - 2x20 s et les deux autres. Néanmoins, nous avons choisi le couple vitesse 10 – 2x10 s qui présente une des dispersions les plus faibles et est le plus rapide à mettre en œuvre.

1.3.2 Objectif 2 : détermination de l'impact du refroidissement du caillé tamisé avant mixage sur l'homogénéité des sous-échantillons

Lors d'essais préliminaires, nous avons observé une diminution de l'hétérogénéité entre les sous-échantillons créés à partir d'un échantillon de caillé refroidi ($\sim 15^{\circ}\text{C}$). Ce phénomène peut être expliqué par la diminution de la perméabilité du réseau protéique et de la synérèse par l'abaissement de la température (Fagan *et al.*, 2017). La température a pu également jouer un

rôle dans la fluidité de la matière grasse, fluidité qui augmente en approchant la température de 40 °C (Lucey *et al.*, 2003). L'état de la matière grasse et la limitation de la synérèse a probablement permis un meilleur broyage et une stabilité accrue des sous-échantillons. Il était donc intéressant de confirmer que la température du caillé au moment du mixage, ajouté au couple vitesse/durée choisi, permettait d'améliorer davantage l'efficacité de la méthode de sous-échantillonnage.

L'échantillon de caillé mixé « à chaud » est à une température de ~30 °C, proche de celle de la cuve (32 °C). Le refroidissement de l'échantillon mixé « à froid » a été choisi de manière à atteindre une température assez basse sans que le temps de refroidissement nécessaire ne soit trop important. De plus, un refroidissement trop intense pourrait entraîner une dissolution des minéraux liés aux caséines. La température de 15 °C au cœur de

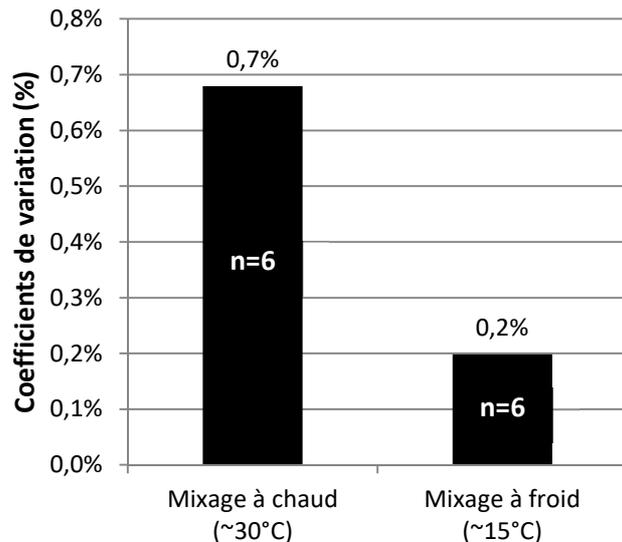


Figure 34 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés par mixage à chaud (30°C) et à froid (15°C), vitesse 10 – 2 x 10 s.

l'échantillon a été choisie car elle peut être atteinte en 10 minutes lorsque le caillé est mis à refroidir dans la glace fondante. Elle permet également de réduire la température du caillé de moitié avec un risque moindre d'entraîner la dissolution de minéraux liés aux caséines. Dans le cas du lait, le stockage de lait à 4 °C pendant 24h entraîne la solubilisation de 4,5 % du calcium lié au caséines (Ali *et al.*, 1980). Nous pouvons estimer que cette solubilisation est réduite à 0,03 % en 10 min à 4 °C. Il est donc possible que la solubilisation du calcium lié aux caséines du caillé soit faible, d'autant plus que la température de l'échantillon n'atteint pas 4°C.

La Figure 34 présente la variation de teneur en MS entre les sous-échantillons créés par mixage « à chaud » et « à froid » à vitesse 10 – 2x10 s. La dispersion de la teneur en MS des sous-échantillons est de 0,7 % pour le mixage « à chaud » contre 0,2 % pour le mixage « à froid ». La dispersion de 0,7 % est surprenante car le même couple (à la même température) a présenté une dispersion de 0,3 % dans la partie 1.3.1. Ces deux résultats ayant été obtenus

un jour différent et avec du caillé provenant de fabrications différentes, cette variabilité peut être attribuable à la variabilité expérimentale.

Néanmoins, réalisés dans les mêmes conditions, le mixage « à froid » permet de réduire la dispersion de teneur en MS entre les sous-échantillons par rapport au mixage « à chaud ». Refroidi avant mixage, le caillé a déjà commencé à se stabiliser. L'agitation moléculaire a été réduite avec l'abaissement de la température, ainsi la synérèse due à la réorganisation du réseau de caséines ralentit et la matière grasse se fige.

1.3.3 Objectif 3 : comparaison entre deux méthodes de sous-échantillonnage : par mixage du caillé tamisé et par répartition du caillé tamisé non mixé

La méthode de sous-échantillonnage avec le répartiteur présente l'avantage d'être très rapide : après tamisage du caillé, celui-ci est immédiatement versé dans le répartiteur et réparti en sous-échantillons en quelques secondes. Cette expérience a pour but de déterminer quelle méthode, entre le répartiteur et le sous-échantillonnage par mixage, permet d'obtenir le moins de variation de teneur en MS.

La variation maximale de teneur en MS entre les sous-échantillons de caillé créés par le répartiteur est de 3 % tandis que cette variation est de 0,2 % entre les sous-échantillons

mixés (Figure 35). Ce résultat peut s'expliquer par une hétérogénéité de l'humidité du gâteau de caillé tamisé qui est probablement plus humide au fond du tamis que sur le dessus. Dans ce cas, il est possible que certains sous-échantillons soient créés avec du caillé plus humide que d'autres. La création de de sous-échantillons par mixage est donc préférable au répartiteur.

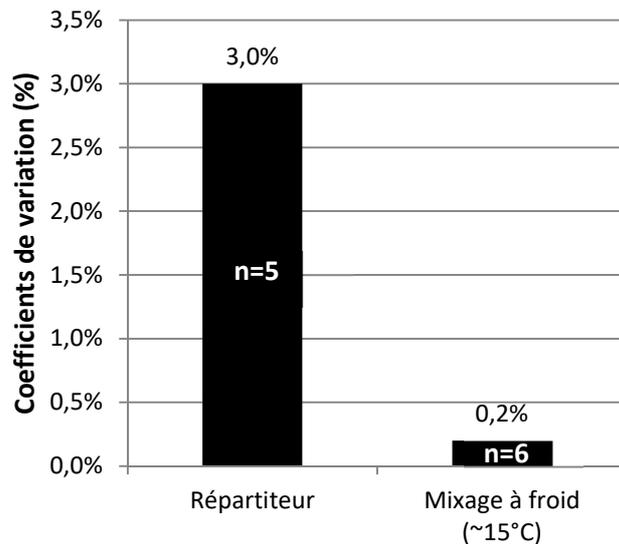


Figure 35 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés par le répartiteur et par le mixage à froid, (vitesse x – 2 x xx s).

1.3.4 Conclusion sur la méthode de sous-échantillonnage

Ces expériences ont permis de formaliser la méthode de création des sous-échantillons de caillé. Après tamisage, l'échantillon de caillé est refroidi pendant 10 minutes dans la glace fondante afin d'atteindre une température d'environ 15 °C. Le caillé est ensuite mixé au Thermomix® à vitesse 10 pendant 2x10 s. Ce dernier est ensuite réparti en sous-échantillons qui sont immédiatement stockés dans la glace fondante afin de les stabiliser rapidement.

1.4 Volet 3 : Comment prélever le mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement ?

Dans la perspective de calculer des bilans matière, nous avons accordé de l'attention à la proportion de caillé dans le mélange caillé/lactosérum. L'objectif est de diminuer la variabilité de la proportion de caillé et de lactosérum dans l'échantillon en formalisant la méthode de prélèvement.

Afin de limiter la variabilité liée au manipulateur, un seul préleveur a été désigné pour réaliser tous les prélèvements en cuve de la mise au point de l'échantillonnage et des expérimentations fromagères. La succession de prélèvements en cuve pour les différentes expériences de mise au point de l'échantillonnage a permis de formaliser la méthode de prélèvement par rapport à plusieurs points :

1.4.1 Détermination de la voie de prélèvement du mélange caillé-lactosérum

L'objectif de cette expérience a été de déterminer si le prélèvement du mélange caillé-lactosérum directement dans la cuve (par le dessus) ou par la vanne de soutirage (en bas de la cuve) génère une variation de la proportion de caillé.

La Figure 36 présente les quantités moyennes de caillé obtenues dans le mélange caillé-lactosérum prélevé par ces deux méthodes ainsi que leurs écart-types. Les écart-types montrent que chacune des méthodes génère une variabilité similaire de proportion de caillé entre les répétitions. Cependant, ces deux méthodes présentent une différence de proportions de caillé récupérées. Le prélèvement par la vanne permet d'obtenir une proportion de caillé

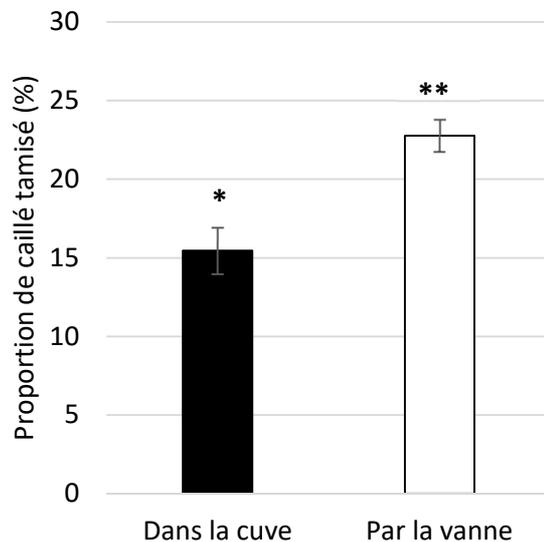


Figure 36 : Proportions moyennes de caillé tamisé par rapport au poids de l'échantillon de caillé-lactosérum prélevé directement dans la cuve ou par la vanne de soutirage (n=15) (Différence significative (*) déterminée avec $p = 5\%$).

dans l'échantillon (~23 %) significativement supérieure au prélèvement par la cuve (~15 %). Ce résultat peut être expliqué par une répartition hétérogène du caillé entre le haut et le bas de la cuve. Malgré le brassage, le caillé semble rapidement tomber au fond de la cuve.

Dans la perspective de calculer des bilans matières en cours de fabrication, les proportions de caillé et de lactosérum doivent être les plus proches possible de celles de la cuve. Avec un prélèvement par la vanne de soutirage, la proportion de caillé obtenue risque d'être supérieure à la proportion réelle dans la cuve. En revanche, en prélevant directement dans la cuve, la profondeur de prélèvement peut être adaptée pour prélever aux environs de la mi-hauteur de cuve et récupérer une proportion relativement représentative de celle de la cuve. Le prélèvement directement dans la cuve a donc été choisi.

1.4.2 La rotation des brassoires de la cuve

Deux brassoires opposés par rapport à un axe principal permettent le brassage des cuves de fromagerie de l'ENILBio. Un brassoire périphérique fait une révolution complète en suivant le bord de la cuve et un brassoire satellite tourne sur lui-même tandis que son axe fait le tour de la cuve (Figure 37). Le passage des brassoires crée un courant principal allant dans leur sens de rotation (sens horaire), et des courants secondaires dont la proportion de caillé par rapport au lactosérum est visiblement variable. Afin de limiter la variabilité de la proportion de caillé récupérée par rapport au moment de prélèvement, les échantillons ont été prélevés à chaque fois au même moment : après le passage du brassoire fixe.

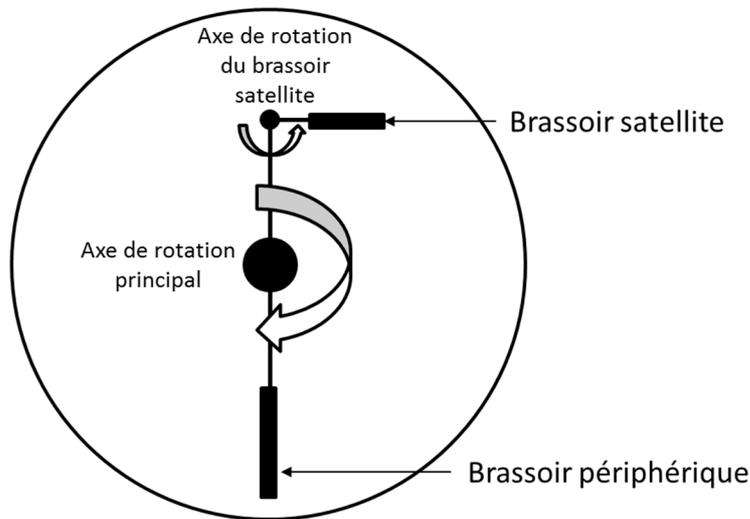


Figure 37 : Représentation de la cuve de fabrication vue du dessus et de la rotation des brassoires.

1.4.3 Détermination du sens de prélèvement du mélange caillé-lactosérum

Le courant principal de la cuve est généré par le mouvement des brassoires qui tournent dans le sens horaire. L'immersion du pichet dans le sens ou à contre-sens de ce courant entraîne l'entrée du mélange caillé-lactosérum dans le pichet avec plus ou moins de force. Le mélange caillé-lactosérum étant hétérogène et bi-phasique, les deux phases le constituant pourraient ne pas réagir de la même manière à l'opposition à la force du courant en ressortant plus ou moins du pichet. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'impact du sens de prélèvement sur la proportion de caillé dans l'échantillon. Nous souhaitons savoir si prélever dans un sens ou dans l'autre permet d'améliorer la reproductibilité du prélèvement.

La Figure 38 présente les proportions de caillé tamisé obtenues en prélevant dans le sens du courant de la cuve et à contre-sens, avant et après délactosage. Les différences de proportions de caillé obtenues entre les prélèvements dans le sens du courant et à contre-sens ne sont pas significatives. Les écart-types entre les deux modalités montrent que les deux modalités génèrent une variabilité similaire de la proportion de caillé obtenue dans l'échantillon de caillé-lactosérum.

Ce facteur n'ayant pas d'impact significatif,

nous avons choisi le sens le plus pratique pour le préleveur : dans le sens du courant.

1.4.4 Conclusion sur la méthode de prélèvement

Le mélange caillé-lactosérum est prélevé au pichet, à mi-hauteur de la cuve, après le passage du brasseur périphérique fixe et dans le sens du courant (sens horaire).

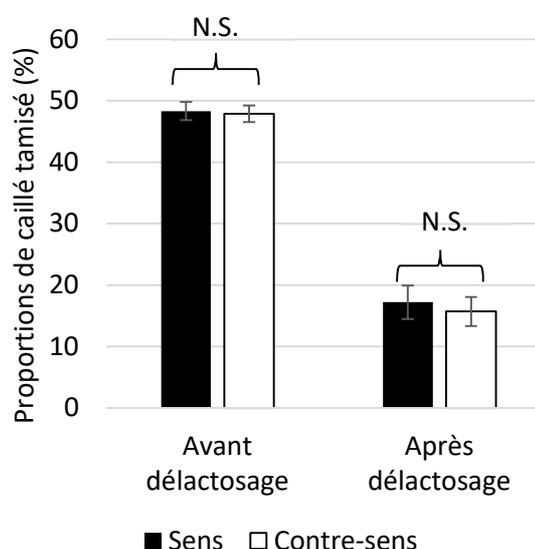


Figure 38 : Proportions moyennes de caillé tamisé par rapport au poids de l'échantillon de caillé-lactosérum prélevé dans le sens du courant et à contre-sens, avant et après délactosage (n=10) (différence non significative (N.S.) déterminée avec $p = 5\%$) (délactosage : E +39%).

1.5 À quel moment de la fabrication l'observation de l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum est-elle la plus pertinente ?

Un point de prélèvement du mélange caillé-lactosérum entre le délactosage et le soutirage de la cuve est prévu dans le plan expérimental dans le but d'étudier l'impact du délactosage sur la composition des phases aqueuses de la cuve. Il a été démontré que la dilution du mélange caillé-lactosérum lors du délactosage crée une brusque diminution de la concentration en lactose du LEG (Huffman, 1985). La concentration en lactose remonte ensuite avec le transfert du lactose du LIG vers le LEG. L'objectif du délactosage étant de réduire la concentration en lactose du caillé, l'atteinte d'un équilibre de concentration en lactose entre LIG et LEG marquerait la fin de l'effet du délactosage sur l'équilibre des solutés. Avec cette expérience, nous souhaitons déterminer le moment où l'équilibre des concentrations en lactose entre LEG et LIG est atteint dans le contexte des fabrications DELAC. Cet équilibre a été évalué avec l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum prélevé dans la cuve (LEG). Le point de prélèvement « après délactosage » doit répondre à deux critères : 1) être au plus proche de l'équilibre de la concentration en lactose et 2) se trouver au même temps technologique par rapport au délactosage pour toutes les modalités.

La Figure 39 présente l'évolution de la concentration en lactose du lactosérum de cuves délactosées et non délactosées entre la fin du décaillage et le soutirage de la cuve. Après la fin du délactosage (à 20 min), la concentration en lactose du lactosérum dans les cuves délactosées a nettement baissé par rapport à la cuve non délactosée à cause de la dilution. Dans les fabrications à 32 g/kg et 41 g/kg, une augmentation de la concentration en lactose au cours du temps est visible après délactosage. Cette dynamique reflète la diffusion du lactose du LIG vers le LEG. La concentration en lactose des cuves délactosées à 41 g/kg augmente également mais évolue faiblement à partir de 30 minutes, suggérant qu'un équilibre a peut-être été atteint entre les concentrations en lactose du LEG et du LIG. En revanche la concentration en lactose des cuves délactosées à 32 g/kg semble pouvoir encore augmenter, bien que la vitesse d'augmentation diminue fortement. Les concentrations en lactose cible ne semblent pas être atteintes car les fabrications 41 g/kg ont une teneur en lactose dans le lactosérum autour de 45 g/kg avant soutirage et les fabrications 32 g/kg atteignent seulement 30 g/kg avant soutirage. Un certain nombre d'incertitudes peut être à

l'origine de ces écarts. Par exemple, la teneur en lactose du lait, à partir de laquelle les protocoles de dé lactosage ont été établis, a été mesurée par analyseur infra-rouge, tandis que l'évolution de la teneur en lactose du lactosérum a été mesurée par HPAEC-PAD. Une partie de l'écart peut donc s'expliquer par la moindre justesse de l'analyse par infra-rouge par rapport à l'HPAEC-PAD. De plus, les volumes d'eau ajoutés à la cuve ont été mesurés avec la jauge de la cuve, conférant une précision relative à la mesure.

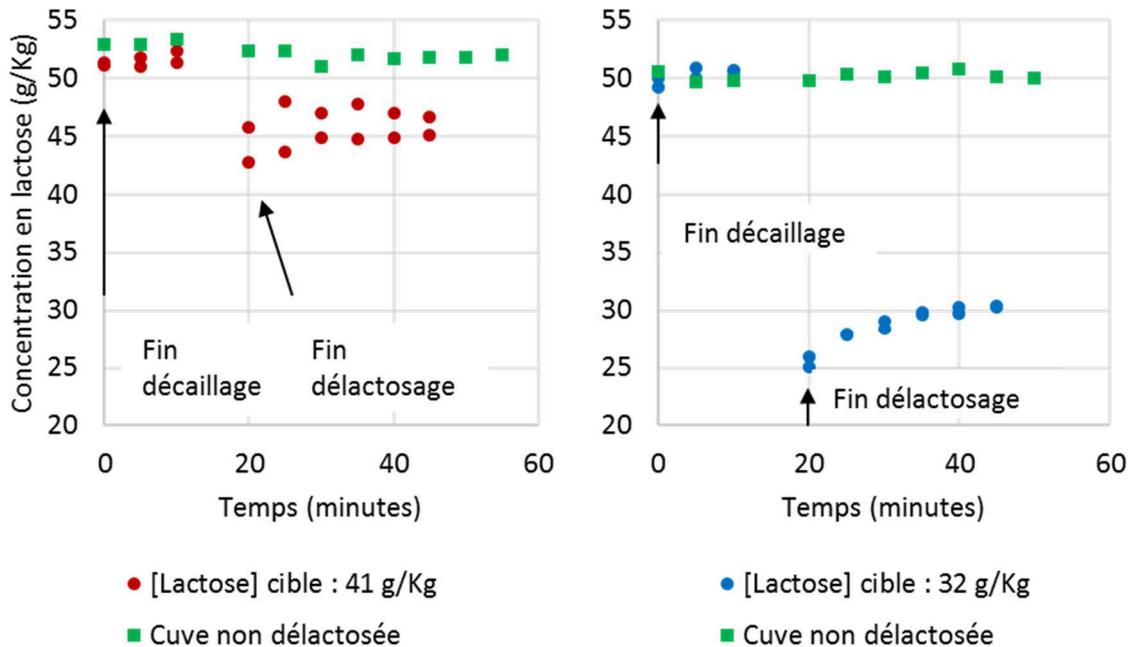


Figure 39 : Évolution de la concentration en lactose dans le lactosérum de fabrications dé lactosées suivant trois niveaux : Non dé lact. (n=1), 41 g/kg LS>E et LS=E (n=2) et 32 g/kg LS>E et LS=E (n=2) entre la fin du décaillage (0 minutes) et le soutirage (45 minutes).

Ces résultats montrent que le temps de brassage après dé lactosage réalisé lors de ces fabrications (25 min, incluant 5 min de chauffage) est suffisant pour permettre à la concentration en lactose de s'équilibrer entre caillé et lactosérum dans les cuves 41 g/kg mais pas suffisant dans les cuves 32 g/kg. Pour déterminer un moment de prélèvement qui sera le même pour toutes les combinaisons de paramètres, nous nous sommes basés sur la fabrication ayant le temps de brassage le plus court : 31 g/kg LS>E (voir Chapitre 2, partie 2.2.4). D'après ces résultats, le moment de prélèvement idéal après dé lactosage serait 25 minutes après le début du chauffage pour toutes les cuves. Cependant, ce temps a été adapté à plusieurs modifications survenues après la réalisation de cette expérience. De nouveaux ajustements des temps de brassage pour atteindre une teneur en MS identique dans tous les

fromages ont montré que le brassage serait plus court dans certaines cuves. De plus, un deuxième point de prélèvement a été placé juste avant soutirage. Pour pouvoir réaliser ces deux points de prélèvement dans la cuve ayant le temps de brassage le plus court (31 g/kg LS>E, 20 minutes entre le début du chauffage et le soutirage), le point de prélèvement après délactosage a été avancé de 5 minutes : il a donc été réalisé **15 minutes après début du chauffage**.

2 Validation des conditions expérimentales

2.1 Introduction

Avant d'interpréter les résultats, nous souhaitons confirmer que les conditions expérimentales définies par notre stratégie ont été respectées. En effet, un écart sur ces conditions expérimentales entraînerait une variation non désirée et pouvant biaiser l'interprétation des résultats. Nous nous sommes intéressés à quatre variables importantes pouvant potentiellement nuire à l'interprétation des résultats : la composition et la qualité sanitaire du lait, le niveau de délactosage atteint, la teneur en MS obtenue au démoulage et l'absence d'un effet « jour ».

2.2 Composition et qualité sanitaire du lait

Le lait est une matière première dont la composition évolue tout au long de l'année, en fonction du stade de lactation de l'animal, de son alimentation, de son état sanitaire, etc. Pour cette raison, les combinaisons de paramètres de délactosage ont été randomisées sur les trois semaines de fabrications expérimentales. Ainsi, les éventuelles variations journalières de la composition du lait ont été réparties sur un maximum de fabrications, atténuant leur impact sur les résultats. Dans cette partie, nous confirmons l'absence de différences de qualité sanitaire et de composition des laits entre les paramètres de délactosage.

La qualité microbiologique et sanitaire des laits a été évaluée avec l'analyse de la FMAR (flore mésophile aérobie revivifiable) et du nombre de cellules somatiques présentes dans le lait (Tableau 20).

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Tableau 20 : Qualité microbiologique et sanitaire du lait frais à sa réception.

	Non dél. (n=6)	LS>E 41 g/kg (n=3)	LS=E 41 g/kg (n=3)	LS>E 32 g/kg (n=3)	LS=E 32 g/kg (n=3)
Cellules/mL (x1000)	299	324	274	274	324
FMAR (UFC/mL)	11 x 10 ⁴	19 x 10 ⁴	30 x 10 ⁴	30 x 10 ⁴	19 x 10 ⁴

Le nombre de cellules ne dépasse pas 400 000/mL, qui est la limite d'acceptabilité donnée par le Règlement (CE) n°853/2004. Les niveaux de populations de la FMAR ont pu être réduites par la pasteurisation pour ainsi diminuer le risque de développement de bactéries pathogènes (Tableau 21).

Le Tableau 21 présente la composition moyenne des laits standardisés utilisés pour chacune des cinq modalités. Il n'y a pas de différence significative de composition de la matière première, sauf dans le niveau de population de la FMAR, qui est significativement inférieur dans le lait LS=E 41 g/kg et constitue donc un point de vigilance. L'absence de différence de composition des autres variables est due en grande partie à la randomisation des fabrications entre les semaines. Nous pouvons conclure que toutes les combinaisons de paramètres ainsi que les fabrications non délactosées ont été fabriquées avec un lait similaire d'un point de vue physico-chimique.

Tableau 21 : Composition des laits standardisés avant ensemencement pour chacune des combinaisons de facteurs (MG= Matière Grasse, MAP=Matière Azotée Protéique, MS=matière sèche, FMAR=Flora Mésophile Aérobie Revivable).

	Non dél. (n=6)	LS>E 41 g/kg (n=3)	LS=E 41 g/kg (n=3)	LS>E 32 g/kg (n=3)	LS=E 32 g/kg (n=3)
MG (g/L)	35,27 ^a	35,20 ^a	35,32 ^a	35,18 ^a	35,32 ^a
MAP (%)	3,65 ^a	3,66 ^a	3,65 ^a	3,65 ^a	3,66 ^a
MS (%)	12,72 ^a	12,74 ^a	12,73 ^a	12,71 ^a	12,73 ^a
Lactose (g/kg)	49,34 ^a	47,81 ^a	49,49 ^a	48,25 ^a	48,32 ^a
Glucose (mg/kg)	77,76 ^a	77,38 ^a	78,21 ^a	78,38 ^a	77,07 ^a
Galactose (mg/kg)	93,41 ^a	89,55 ^a	98,01 ^a	98,16 ^a	88,08 ^a
Citrate (mg/kg)	1460,28 ^a	1455,92 ^a	1453,43 ^a	1456,28 ^a	1421,23 ^a
FMAR (UFC/mL)	39 x 10 ^{3 a}	50 x 10 ^{3 a}	19 x 10 ^{3 b}	26 x 10 ^{3 ab}	37 x 10 ^{3 ab}
Plasmine (DO.10⁴.min-1)	13,09 ^a	13,26 ^a	13,14 ^a	12,90 ^a	13,21 ^a
Plasminogène (DO.10⁴.min-1)	68,56 ^a	68,12 ^a	67,70 ^a	66,74 ^a	68,27 ^a
Ca total (mg/kg)	1180,14 ^a	1201,12 ^a	1193,87 ^a	1174,42 ^a	1174,85 ^a
Ca soluble (mg/kg)	257,25 ^a	259,24 ^a	252,57 ^a	255,76 ^a	260,02 ^a
P total (mg/kg)	910,19 ^a	910,61 ^a	915,08 ^a	918,75 ^a	894,82 ^a
P soluble (mg/kg)	257,25 ^a	259,24 ^a	252,57 ^a	255,76 ^a	260,02 ^a

^{a-e} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative (P < 0,05)

2.3 Objectifs de niveaux de délactosage

Le niveau de délactosage est un des deux paramètres étudiés. Nous souhaitons confirmer que les objectifs de niveau visés, 41 g/kg et 32 g/kg, ont été atteints.

La Figure 40 présente les concentrations en lactose dans le mélange caillé-lactosérum avant soutirage de la cuve. Les fabrications de niveau 32 g/kg présentaient une concentration en lactose proche de la cible (31 g/kg et 32 g/kg). En revanche, les fabrications de niveau 41 g/kg présentaient une concentration en lactose légèrement plus élevée que prévue (42 g/kg et 43 g/kg) mais pas significativement différente. Ces écarts par rapport à l'objectif s'expliquent par l'incertitude

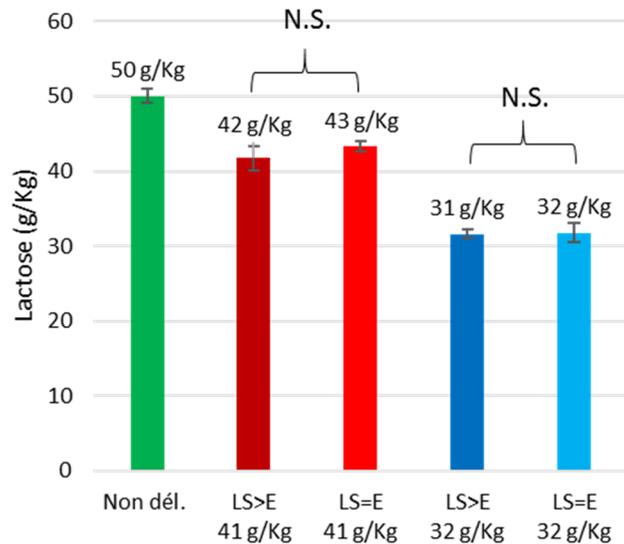


Figure 40 : Concentrations moyennes et écart-types des teneurs en lactose en fonction du procédé de fabrication (N.S.= différences non significatives).

des volumes de lactosérum retirés et d'eau ajoutés, mesurés par pesée et par une jauge plongée dans la cuve, respectivement. Néanmoins, les différences entre les niveaux de délactosage n'étant pas significatives, l'écart de concentration en lactose obtenue par rapport à la cible ne biaise donc pas l'interprétation des résultats.

2.4 Objectif de teneur en MS

L'obtention d'une teneur en MS similaire dans tous les fromages au démoulage est un objectif technologique important pour étudier les effets du délactosage notamment sur les caractéristiques des fromages affinés sans que les conclusions ne puissent être biaisées par des teneurs en humidité différentes. L'objectif était d'obtenir une teneur en MS de 51-52 % au démoulage en ajustant le temps de travail du mélange caillé-lactosérum en cuve.

Les teneurs en MS totale au démoulage ne sont pas affectées par le niveau de délactosage ni par le mode (Tableau 22). La teneur en MS des fromages a été contrôlée par le travail du mélange caillé-lactosérum en cuve. Des teneurs en MS satisfaisantes, en moyenne entre 51,5 et 52,5 ont été obtenues par rapport à la cible (Tableau 22). L'absence de différences

significative et le respect de l'écart de 1 % entre les teneurs en MS permettent de valider l'atteinte de l'objectif technologique.

Tableau 22 : Composition des fromages au démoulage.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
MS (%)	N.S.	52,16 ^a	52,46 ^a	51,97 ^a	N.S.	52,03 ^a	52,41 ^a
MG (%)	N.S.	25,71 ^a	25,71 ^a	25,95 ^a	N.S.	25,78 ^a	25,88 ^a
ESD (%)	N.S.	26,45 ^a	26,75 ^a	26,02 ^a	N.S.	26,25 ^a	26,53 ^a
G/S (%)	N.S.	49,29 ^a	49,01 ^a	49,93 ^a	N.S.	49,56 ^a	49,38 ^a
HFD (%)	N.S.	64,39 ^a	63,99 ^a	64,85 ^a	N.S.	64,64 ^a	64,21 ^a
MAT (%)	N.S.	23,17 ^a	23,35 ^a	23,11 ^a	N.S.	23,21 ^a	23,26 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage ($P < 0,05$).

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

Ainsi, l'observation de différentes concentrations en solutés telles que le lactose pourra être attribuée à l'impact du dé lactosage et non à une quantité de phase aqueuse (qui est le solvant) plus importante. De plus, des teneurs en MS différentes créeraient un biais dans l'interprétation des propriétés fonctionnelles et sensorielles en fin d'affinage car induiraient des concentrations en protéines et en MG différentes. L'ajustement des teneurs en MS a permis d'obtenir des teneurs en matières azotées (MAT) et en MG similaires entre les niveaux de dé lactosage (Tableau 22).

2.5 Absence d'un effet jour

Sur les trois semaines d'expérience, les fabrications fromagères ont été randomisées pour minimiser les biais liés à des variations entre les semaines. Cependant, les cinq modalités étudiées (Non dé lactosée, LS>E 41 g/kg, LS=E 41 g/kg, LS>E 32 g/kg et LS=E 32 g/kg) ont été fabriquées sur deux jours chaque semaine à raison de 3 fabrications par jour (la fabrication non dé lactosée étant réalisée deux fois). Les deux moitiés de chaque série ont donc potentiellement été fabriquées dans des conditions différentes. Le déroulement du plan expérimental sur trois semaines nous expose également à un risque de variation de la composition du lait. Il était donc nécessaire dans un premier temps de confirmer que les combinaisons de paramètres de dé lactosage ont été fabriquées avec des laits similaires. Il était nécessaire également de confirmer que les fabrications des deux jours de chaque semaine se sont déroulées dans les mêmes conditions en validant l'absence de l'effet « Jour ».

La fabrication non dé lactosée étant la seule qui ait été fabriquée chaque jour, cette fabrication peut être utilisée comme un témoin des conditions de fabrication. L'impact du facteur « Jour » sur les caractéristiques physico-chimiques étudiées sont présentées dans le Tableau 23. Le premier jour de fabrication est codé « Jour 1 » et le deuxième jour de fabrication est codé « Jour 2 ».

Tableau 23 : Valeurs moyennes et significativité des différences obtenues par ANOVA entre « Jour 1 » et « Jour 2 » (n=3) sur des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des fabrications non dé lactosées.

	ES Lait	MG Lait	MAP Lait	pH soutirage	ES soutirage	ES Démoulage	pH Démoulage
Jour 1	12,71 ^a	35,02 ^a	5,70 ^a	6,61 ^a	40,98 ^a	52,17 ^a	4,94 ^b
Jour 2	12,73 ^a	35,51 ^a	5,75 ^a	6,61 ^a	41,23 ^a	52,16 ^a	5,00 ^a
Sign.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,04

Le Tableau 23 montre qu'il n'y a pas de différences d'ES, de MG et de MAP du lait entre les deux jours de fabrications de chaque semaine et donc que toutes les fabrications ont été faites avec une matière première similaire. Il n'y pas de différences non plus sur le pH et l'ES au soutirage ainsi que sur l'ES à 20h, soulignant ainsi le respect rigoureux des temps technologiques prévus. La différence de pH à 20h apparait significative entre les deux jours, mais cette différence est inférieure à 0,1 qui correspond à l'incertitude de mesure du pH-mètre utilisé. Nous ne pouvons donc pas conclure à une différence significative de pH.

L'absence de l'effet « Jour » nous permet de valider que chaque série de fabrication a été réalisée dans les mêmes conditions.

3 Impact du dé lactosage sur les dynamiques observées en cuve et sur les caractéristiques du fromage au dé moulage

3.1 Introduction

Le dé moulage marque la fin de la fabrication et le début de l'affinage du fromage : à ce moment du processus, l'égouttage du fromage est presque terminé, limitant ainsi les échanges entre l'intérieur et l'extérieur du fromage. Puis, l'affinage va consister au développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage avec le potentiel microbologique, enzymatique présent au dé moulage du fromage. Ainsi, les caractéristiques

des fromages obtenues à ce stade de la fabrication sont déterminantes pour le déroulement ultérieur de l'affinage.

Les caractéristiques physico-chimiques, les activités enzymatiques et les indices de protéolyse, les caractéristiques rhéologiques et les populations de bactéries lactiques des fromages au démoulage (et après salage pour la teneur en NaCl, l' a_w) sont présentés dans le Tableau 24.

Un résultat majeur peut être relevé en premier lieu : seul le niveau de délactosage a un impact significatif sur les variables mesurées. Les deux modes de délactosage conduisent à des fromages dont les caractéristiques ne sont pas significativement différentes, reflétant des dynamiques similaires pendant la fabrication (Annexes 2 à 13). Ces résultats seront donc décrits et discutés principalement par rapport au niveau de délactosage qui est le seul paramètre étudié pouvant expliquer les impacts du délactosage sur ces descripteurs. L'impact du délactosage sur la microstructure du fromage sera également décrit et discuté.

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Tableau 24 : Composition fine, caractéristiques physico-chimiques, rhéologie, indices de protéolyse et activités enzymatiques des fromages au démoulage.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
ESD (%)	N.S.	26,45 ^a	26,75 ^a	26,02 ^a	N.S.	26,25 ^a	26,53 ^a
Sucres résiduels (g/kg) (lactose, glucose, galactose)	***	2,44 ^a	0,79 ^b	0,16 ^c	N.S.	0,46 ^a	0,43 ^a
Lactose (g/kg)	***	1,97 ^a	0,36 ^b	0,06 ^c	N.S.	0,23 ^a	0,17 ^a
Glucose (mg/kg)	N.S.	6,92 ^a	7,03 ^a	6,85 ^a	N.S.	6,85 ^a	7,03 ^a
Galactose (mg/kg)	***	470,83 ^a	398,27 ^a	93,03 ^b	N.S.	238,34 ^a	252,97 ^a
Lactates (g/kg)	***	17,19 ^a	16,74 ^a	13,96 ^b	N.S.	15,43 ^a	15,28 ^a
Citrates (g/kg)	N.S.	0,31 ^a	0,32 ^a	0,26 ^a	N.S.	0,29 ^a	0,29 ^a
CaT/ESD (%)	N.S.	2,67 ^a	2,64 ^a	2,71 ^a	N.S.	2,70 ^a	2,65 ^a
CaSOL/CaT (%)	***	47,42 ^a	46,11 ^a	38,43 ^b	N.S.	42,53 ^a	42,01 ^a
Ca INSOL 24 h (%)	***	0,37 ^a	0,38 ^a	0,43 ^b	N.S.	0,41 ^a	0,41 ^a
Ca INSOL 48 h (%)	***	0,36 ^a	0,38 ^a	0,43 ^b	N.S.	0,41 ^a	0,40 ^a
P T/ESD (%)	N.S.	1,45 ^a	1,40 ^a	1,41 ^a	N.S.	1,41 ^a	1,40 ^a
P SOL/P T (%)	*	20,93 ^a	20,42 ^a	17,32 ^b	N.S.	19,04 ^a	18,70 ^a
pH	***	4,97 ^a	4,97 ^a	5,10 ^b	N.S.	5,04 ^a	5,04 ^a
Lactocoques (UFC/g)	N.S.	9,9 x 10 ^{8 a}	9,5 x 10 ^{8 a}	9,3 x 10 ^{8 a}	N.S.	9,2 x 10 ^{8 a}	9,7 x 10 ^{8 a}
Leuconostocs (UFC/g)	N.S.	8,8 x 10 ^{7 a}	8,1 x 10 ^{7 a}	8,6 x 10 ^{7 a}	N.S.	8,6 x 10 ^{7 a}	8,0 x 10 ^{7 a}
Pouvoir tampon (dB/dpH) au démoulage sur la zone de pH 3-5,5	***	0,49 ^a	0,49 ^a	0,39 ^b	N.S.	0,71 ^a	0,71 ^a
NS/NT (%)	N.S.	5,94 ^a	5,89 ^a	5,95 ^a	N.S.	5,87 ^a	5,96 ^a
NPN/NT (%)	N.S.	2,49 ^a	2,50 ^a	2,50 ^a	N.S.	2,58 ^a	2,43 ^a
NPN/NS (%)	N.S.	42,07 ^a	42,59 ^a	42,32 ^a	N.S.	43,86 ^a	41,04 ^a
Activité plasmine (DO.10 ⁴ /min)	N.S.	38,73 ^a	39,57 ^a	38,95 ^a	N.S.	38,72 ^a	39,81 ^a
Activité plasminogène (DO.10 ⁴ /min)	N.S.	118,29 ^a	119,35 ^a	115,10 ^a	N.S.	117,23 ^a	117,22 ^a
Activités protéasiques acides (IMCU/kg)	**	88,11 ^a	84,05 ^a	77,57 ^b	N.S.	81,80 ^a	79,82 ^a
a _w au démoulage	N.S.	0,94 ^a	0,94 ^a	0,94 ^a	N.S.	0,94 ^a	0,94 ^a
a _w après saumurage (48 h)	N.S.	0,93 ^a	0,93 ^a	0,93 ^a	N.S.	0,93 ^a	0,93 ^a
NaCl/H ₂ O (48 h)	N.S.	2,44 ^a	2,45 ^a	2,48 ^a	N.S.	2,47 ^a	2,46 ^a
Module de déformabilité (kPa)	N.S.	96,75 ^a	95,20 ^a	87,08 ^a	N.S.	87,44 ^a	94,84 ^a
Déformation à la fracture (-)	N.S.	0,59 ^a	0,60 ^a	0,58 ^a	N.S.	0,59 ^a	0,59 ^a
Contrainte à la fracture (kPa)	N.S.	135,50 ^a	140,12 ^a	120,73 ^a	N.S.	127,13 ^a	133,72 ^a
Énergie à la fracture (kJ/m ³)	N.S.	32,27 ^a	33,89 ^a	29,32 ^a	N.S.	30,95 ^a	32,26 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage (P < 0,05)

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001.

3.2 Extrait sec dégraissé

Les solutés du caillé et du fromage sont contenus dans leur solvant, qui est la phase aqueuse. Pour cette raison, l'étude de l'impact du délactosage sur les solutés nécessite de prendre en compte la dynamique d'égouttage du caillé qui est décrite et discutée dans cette partie au travers de l'évolution de l'ESD.

L'évolution de la teneur en ESD du caillé au cours de la fabrication est présentée dans la Figure 41. Pour les trois niveaux de délactosage, l'égouttage se produit en majorité au cours du travail en cuve, entre 1,5 h et 2,5 h. Sur cette période, la teneur en ESD du caillé augmente de 8 %. Le pressage entraîne ensuite une augmentation de 4,5 % de la teneur en ESD, puis le fromage est laissé à s'égoutter en moule jusqu'au démoulage à 24 h. Entre la fin du pressage et le démoulage, la teneur en ESD augmente d'environ 1 %. L'égouttage du fromage est donc important jusqu'à la fin du pressage, moment à partir duquel les solutés se concentrent dans le fromage. Il n'y a pas de différence significative de la teneur en ESD entre les niveaux de délactosage, mais le caillé des fabrications 32 g/kg tend à présenter une teneur en ESD plus faible que celle des autres fabrications, probablement par l'élimination d'une plus grande quantité de solutés et notamment de lactose.

Les temps de travail en cuve ont été ajustés aux paramètres de délactosage pour obtenir des teneurs en MS similaires au démoulage, mais l'évolution des teneurs en ESD ne montre pourtant pas de différence de vitesse d'égouttage en cuve entre les niveaux. De plus, l'augmentation de la teneur en ESD du caillé tend à être la plus rapide dans les caillés Non dél. et la moins rapide dans les caillés 32 g/kg. En effet, l'évolution de la teneur en ESD ne reflète pas l'égouttage seul car l'élimination du LIG du caillé entraîne l'élimination des solutés qu'il contient et qui font partie de la MS. De plus, cette élimination des solutés est accentuée pendant l'égouttage en cuve par le délactosage. Ainsi, l'augmentation de teneur en ESD est moins rapide en cuve dans les fabrications délactosées car la perte de MS soluble est plus importante en fonction du niveau de délactosage. En outre, la teneur en ESD des fabrications 32 g/kg tend à être plus faible car ce niveau extrême a éliminé davantage de composés solubles. L'évolution de la teneur en ESD ne permet donc pas d'étudier l'impact du délactosage sur la vitesse d'égouttage, mais elle permet de déterminer la dynamique

d'égouttage dans son ensemble qui est nécessaire pour l'explication des autres impacts du délactosage.

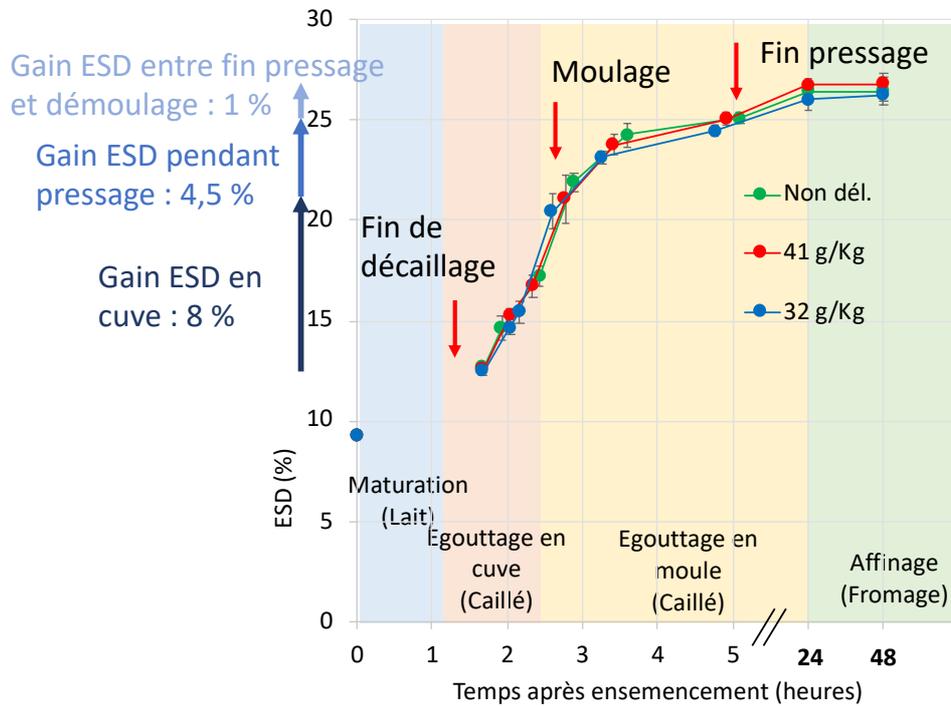


Figure 41 : Évolutions de la teneur en ESD du lait, du caillé tamisé et du fromage en début d'affinage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

3.3 Sucres

L'impact du délactosage sur les concentrations en sucres est majeur. Premièrement, cet impact affecte l'acidification et potentiellement tous les phénomènes qui y sont liés. Deuxièmement, les sucres étant les composés solubles les plus importants dans le lait et le caillé, l'impact du délactosage sur leur concentration peut donc expliquer en partie les variations de teneur en ESD qui ont été observées pendant la fabrication et qui se répercutent sur les autres résultats.

Au démoulage, les concentrations en sucres résiduels dans les fromages sont significativement différentes entre les trois niveaux de délactosage (Tableau 24). Trois sucres ont été dosés : le lactose, le galactose et le glucose dont les teneurs au démoulage (24 h) et à 48 h sont présentées dans la Figure 42. Les différences de concentration en lactose sont significativement différentes entre les trois niveaux de délactosage tandis que les différences de concentration en galactose ne sont significatives qu'entre Non dél. et 41 g/kg d'un côté et

32 g/kg de l'autre. En revanche, les concentrations en glucose sont quasi-nulles pour les trois niveaux à ce moment-là.

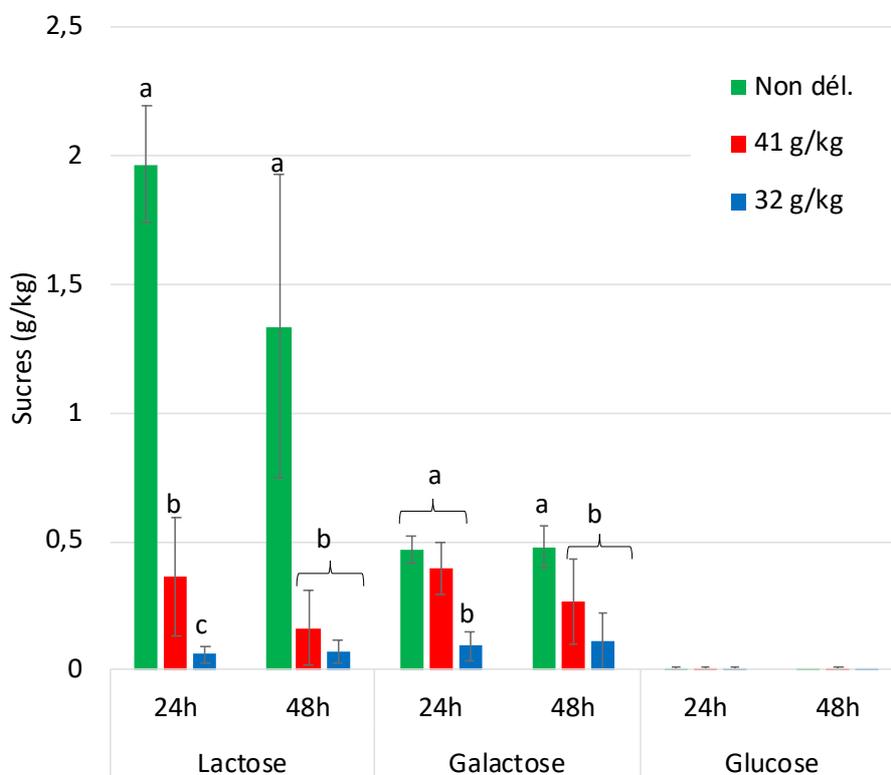


Figure 42 : Concentrations en lactose, galactose et glucose au démoulage (24 h) et à 48 h (Différentes lettres indiquent une différence significative avec $p < 0,05$).

3.3.1 Lactose

Pour comprendre par quels mécanismes les concentrations en lactose ont été modifiées au démoulage, leurs évolutions dans le lait, caillé et fromage ont été suivies et sont présentées dans la Figure 43 (a). Dans le caillé, ces concentrations sont similaires entre les trois niveaux 30 s avant délactosage (1,7 h). À partir des points autour de 2 h (points « après délactosage »), les concentrations en lactose dans le caillé sont significativement différentes et montrent que plus le niveau de délactosage est élevé et plus la concentration en lactose est basse, comme attendu. Ce point à 2 h est celui qui a été déterminé lors de la mise au point de l'échantillonnage comme étant le moment où l'équilibre des concentrations en lactose du LEG et LIG en réponse au délactosage est atteint (sauf dans les fabrications 32 g/kg). En effet, la Figure 43 (b) montre que le délactosage affecte la concentration en lactose du caillé entre 1,7 h (30 s avant délactosage) et ~2 h (15 min après début du chauffage), puis les concentrations en lactose évoluent à la même vitesse à partir du point à 2 h. À partir de ce point, la diminution de la concentration en lactose

suit la même cinétique pour les 3 niveaux et les différences de concentration restent stables entre les niveaux. Entre la fin du pressage et le démoulage (24 h), les différences de concentrations en lactose diminuent mais restent significatives. À partir de 48 h, ces différences ne sont plus significatives entre les niveaux 41 g/kg et 32 g/kg, tandis que la concentration en lactose du niveau Non dél. reste significativement plus élevée (Figure 43).

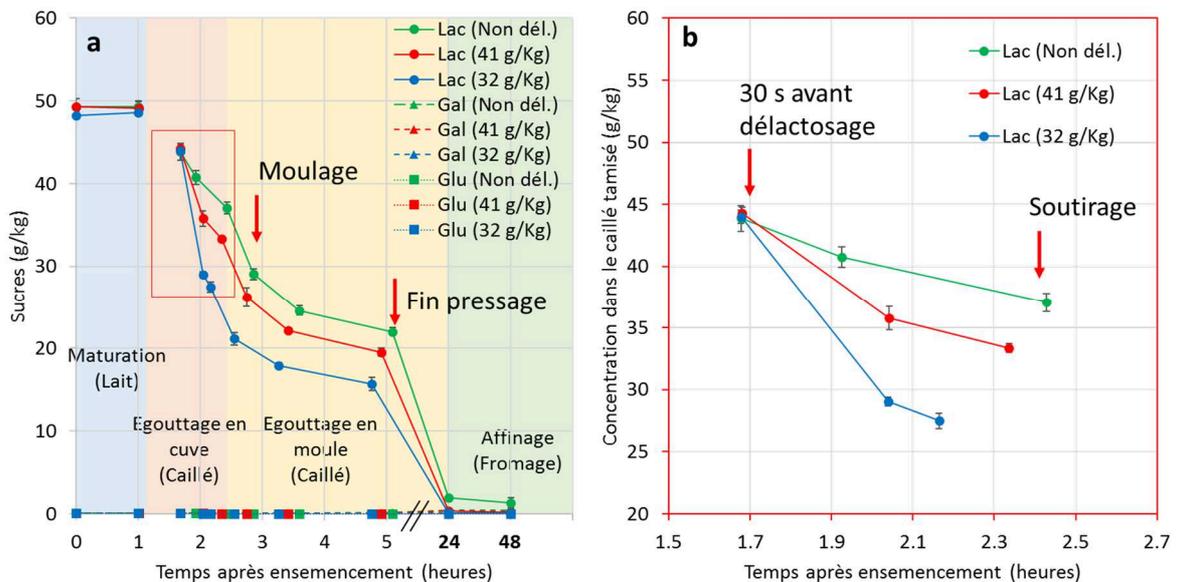


Figure 43 : Évolutions des concentrations en lactose, galactose et glucose dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps (a) et focus sur l'évolution du lactose dans le caillé tamisé entre le début du dé lactosage et le soutirage de la cuve (b).

La diminution de la concentration en lactose du caillé est le résultat de deux phénomènes. D'une part, l'égouttage du caillé élimine le lactose en même temps que le LIG : ceci est mis en évidence avec la fabrication Non dél. car malgré l'absence de dé lactosage, la concentration en lactose diminue (Figure 43 (b)). D'autre part, le dé lactosage crée une différence significative de concentration en lactose en fonction du niveau de dilution après dé lactosage (Figure 43 (b)). Mais par quel mécanisme le dé lactosage accélère-t-il la sortie du lactose du caillé ? 1) Est-ce que la diminution accrue de la concentration en lactose reflète une augmentation accrue de l'égouttage du caillé ? Ou 2) est-ce que le lactose diffuse du LIG vers le LEG poussé par une différence de concentration entre les deux phases aqueuses ? L'observation de l'évolution de la concentration en lactose dans le LIG seul peut permettre de répondre à cette question. Ainsi, les concentrations en lactose dans le LIG obtenues par calcul en soustrayant la teneur en MS du caillé, sont présentées dans la Figure 44 (b) tandis que les concentrations en lactose

dans l'échantillon de caillé entier (matrice + LIG) sont présentées dans la Figure 44 (a). La Figure 44 (a) montre que la concentration en lactose du caillé des fabrications Non dél. diminue tandis que la concentration du LIG seul de ces mêmes fabrications n'évolue pas (Figure 44 (b)). Cela confirme que dans la fabrication Non dél., la concentration en lactose du caillé diminue sous l'effet de l'égouttage du caillé, et donc par le déplacement du LIG. En revanche, la Figure 44 (b) montre que la concentration en lactose du LIG des fabrications 41 g/kg et 32 g/kg diminue entre le point à 1,7 h et le point à 2,0 h. Cela montre que la concentration en lactose du caillé diminue d'une part, à cause de l'égouttage et donc du déplacement de son LIG et d'autre part, à cause d'un déplacement du lactose indépendamment de la phase aqueuse, engendré par la dilution du LEG. Ce résultat rejoint les conclusions de Hou *et al.* (2012) et Huffman (1985) qui expliquent l'impact du délactosage sur la concentration en lactose du caillé par la création d'une différence de pression osmotique entre LIG et LEG. À partir du point après délactosage (à ~2 h), la concentration en lactose dans le LIG des caillés 41 g/kg et 32 g/kg diminue très faiblement, confirmant que l'équilibre des concentrations en lactose entre LIG et LEG est presque atteint (Figure 44 (b)). Néanmoins, la diminution de la concentration en lactose dans le caillé continue car le caillé est en cours d'égouttage (Figure 44 (a)).

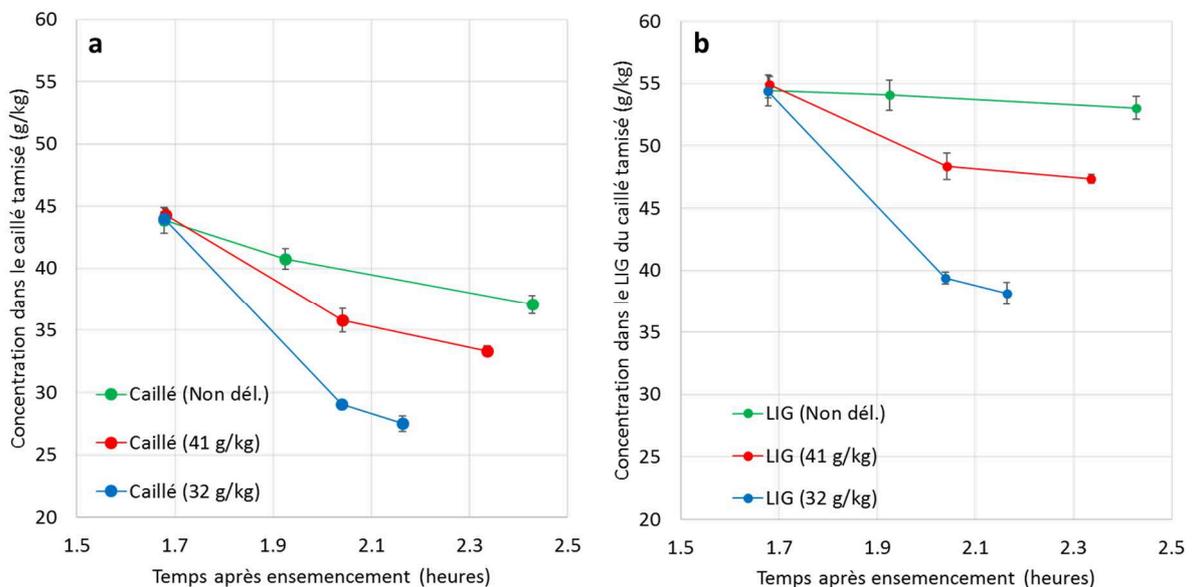


Figure 44 : Évolutions des concentrations en lactose dans le caillé (dont LIG) (a) et évolutions des concentrations en lactose dans le LIG (b).

Après le soutirage, les concentrations en lactose du caillé évoluent à la même vitesse quel que soit le niveau de délactosage, reflétant un égouttage similaire provoqué par le pré-pressage et le pressage, identiques pour toutes les fabrications (Figure 43 (a)). À partir de la fin du pressage, l'égouttage est presque terminé, la diminution de la concentration en lactose est donc due principalement à la dégradation du lactose par les bactéries lactiques. Au démoulage, les différences de concentration en lactose résiduel reflètent les différences créées par le niveau de délactosage. Dans les fromages 32 g/kg, le délactosage a éliminé suffisamment de lactose pour que le lactose résiduel puisse être consommé presque entièrement avant le démoulage. En revanche, dans les fabrications 41 g/kg et Non dél., les concentrations significativement plus élevées montrent qu'il reste du lactose non dégradé, risquant d'entraîner une post-acidification. À 48 h, les concentrations en lactose dans les fromages Non dél. et 41 g/kg ont encore diminué, montrant que du lactose a été dégradé. La concentration en lactose des fromages 41 g/kg est quasi-nulle et à ce stade, non significativement différente de celle des fromages 32 g/kg, suggérant que la post-acidification dans ces fromages est proche de la fin. En revanche, du lactose reste dans les fromages Non dél., suggérant que la post-acidification va se poursuivre après 48 h.

3.3.2 Glucose et galactose

Le glucose et le galactose sont présents en quantités similaires dans le lait mais n'évoluent pas de la même manière au cours de la fabrication (Figure 45). À partir de 1,7 h (30 s avant délactosage) les concentrations en glucose diminuent et atteignent une concentration quasi-nulle en début de pressage (à 3,5 h) pour toutes les fabrications. Aucune différence de concentration en glucose n'est significative entre les trois niveaux. Pendant ce laps de temps, la concentration en galactose stagne puis augmente à partir de 3,5 h jusqu'à la fin du pressage (5 h) sans différences significatives entre les niveaux. Au démoulage, la concentration en galactose des fabrications 32 g/kg semble être restée au même niveau que pendant la fabrication (0,1 g/kg) avec une variabilité (écart-type) comprenant les concentrations du lait et du caillé en fin de pressage. À ce stade, les concentrations en galactose des fabrications 41 g/kg et Non dél. sont similaires entre elles (autour de 0,45 g/kg) mais significativement plus élevées que celles des fabrications 32 g/kg (Figure 45). À 48 h, seule la concentration en galactose des fabrications 41 g/kg a évolué et est désormais similaire à celle des fabrications 32 g/kg et significativement différente de celle des fabrications Non dél.

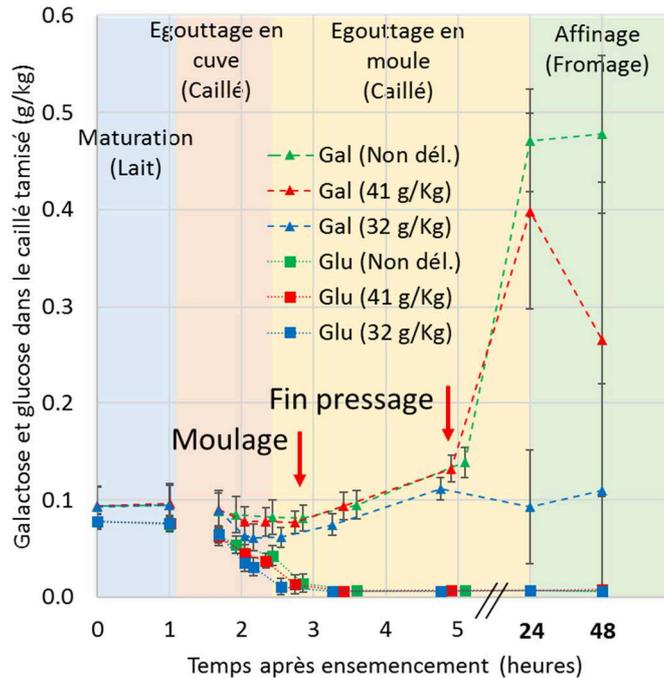


Figure 45 : Évolutions des concentrations en galactose et glucose dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

La diminution de la concentration en glucose s'explique par deux phénomènes : 1) l'égouttage du caillé et 2) sa consommation par les bactéries lactiques. En effet, à partir de 1,7 h (30 s avant dé lactosage), l'égouttage du caillé est en cours et une grande partie du glucose est éliminée avec le LIG. De plus, le glucose est consommé prioritairement par les bactéries lactiques par rapport au galactose et la disparition presque totale de ce sucre reflète sa dégradation directe (Benthin *et al.*, 1994).

Le galactose évolue différemment du glucose car sa concentration reste stable pendant l'égouttage en cuve malgré l'égouttage du caillé (Figure 45). La concentration reste stable car parallèlement à l'élimination du galactose présent dans le LIG par l'égouttage, du galactose est rejeté par les bactéries lactiques suite à l'hydrolyse du lactose. En effet, ce phénomène a été observé par Benthin *et al.* (1994) qui ont rapporté l'expulsion du galactose par *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, également présent dans nos fromages. Les auteurs précisent que le métabolisme de cette bactérie permet une dégradation plus rapide du glucose que du galactose. Ainsi, tant que du lactose est disponible, le galactose s'accumule dans la cellule et est expulsé lorsque celui-ci atteint un niveau de concentration toxique pour la cellule. Cela explique en partie l'augmentation de la concentration en galactose pendant l'égouttage en

moule (Figure 45). En effet d'une part, le ralentissement de l'égouttage permet aux solutés de se concentrer dans le fromage et d'autre part, le galactose est rejeté par les bactéries lactiques car du lactose est encore disponible dans le milieu.

Les différences de concentration en galactose entre les niveaux au démoulage sont liées à la limitation du lactose (Figure 45). Entre la fin du pressage et le démoulage, le lactose a été consommé et du galactose a été libéré. Dans les fabrications délactosées à 32 g/kg, le lactose est devenu limitant dans cette période et le seul sucre dégradé restant dans le fromage était le galactose résiduel libéré pendant la dégradation du lactose. Dans ces fromages, le galactose résiduel a donc été davantage dégradé que dans les fromages délactosés à 41 g/kg et Non dél. qui présentaient des concentrations en lactose non-limitantes avant le démoulage. Benthin *et al.* (1994) montrent en effet que le galactose expulsé pendant la dégradation du lactose est réabsorbé et dégradé par *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* particulièrement lorsque le lactose du milieu est épuisé. À 48 h, les concentrations en galactose ont peu évolué par rapport aux concentrations au démoulage, probablement à cause du faible pH des fromages (autour de pH 5) qui pourrait ralentir l'activité des bactéries lactiques pour la dégradation du galactose, plus difficilement métabolisable (Figure 45).

Les impacts du niveau de délactosage sur les concentrations en galactose au démoulage doivent être relativisés car ces concentrations sont faibles : une grande partie du galactose libéré entre la fin du pressage et le démoulage a été dégradée. En effet, si on considère que l'égouttage est terminé à la fin du pressage et que la différence de concentration en lactose entre la fin du pressage et le démoulage est due intégralement à la dégradation du lactose (1 mole de lactose + 1 mole d'eau=360 g/mol) par les bactéries lactiques, 8 à 11 g/kg de chacun des deux oligosides auraient été libérés. Le glucose est dégradé immédiatement à la suite de sa libération mais 8 à 11 g/kg de galactose auraient été mesurés dans les fromages s'il n'avait pas été consommé. Or, la concentration résiduelle en galactose au démoulage est dans notre cas comprise entre 0,10 et 0,45 g/kg, montrant qu'une grande majorité du galactose a donc été dégradée avant le démoulage. La concentration en sucres résiduels totaux au démoulage permet d'estimer la quantité d'acide lactique pouvant potentiellement être produite pendant l'affinage et donc l'ampleur de la post-acidification. Dans notre cas, 2,44 g/kg, 0,79 g/kg et 0,16 g/kg d'acide lactique sont susceptibles d'être produits pendant l'affinage dans les

fromages Non dél., 41 g/kg et 32 g/kg respectivement, qui correspondent à la quantité de sucres résiduels dans le fromage au démoulage (Tableau 24).

3.4 Acide lactique

Les concentrations en acide lactique sont significativement différentes au démoulage entre les niveaux Non dél. et 41 g/kg (~17 g/kg d'acide lactique) d'une part et 32 g/kg (14 g/kg d'acide lactique) d'autre part (Tableau 24). Ces différences ne sont apparues qu'à partir de 24 h (démoulage) car les concentrations ont augmenté avec la même vitesse pour les trois niveaux d'une concentration nulle en début de fabrication à 1 g/kg à la fin du pressage (Figure 46). Entre la fin du pressage et le démoulage, les concentrations en acide lactique ont augmenté de 1 g/kg à 14-17 g/kg. Une grande partie de l'acidification du fromage s'est donc déroulée entre la fin du pressage et le démoulage. À 48 h, les concentrations en acide lactique ont peu évolué dans les fromages 41 g/kg et 32 g/kg mais celle des fromages Non dél. a augmenté significativement.

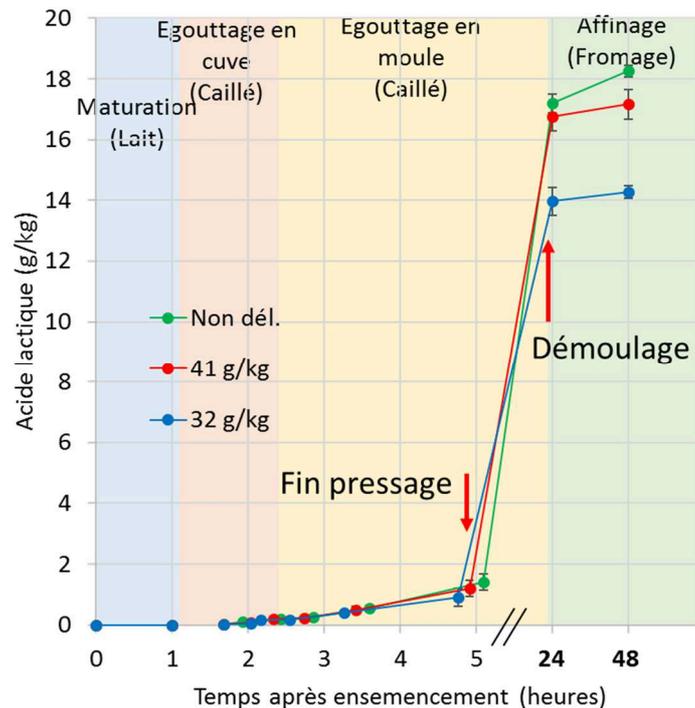


Figure 46 : Évolutions de la concentration en acide lactique dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

L'évolution de la concentration en acide lactique du caillé dépend de la dégradation du lactose par les bactéries lactiques mais également de l'égouttage du caillé. La concentration en acide

lactique augmente faiblement jusqu'à la fin du pressage car une partie est évacuée avec le LIG. L'acide lactique se concentre ensuite de manière plus importante dans le fromage entre la fin du pressage et le démoulage, où l'égouttage a fortement ralenti. Au démoulage, les fromages 32 g/kg présentent une concentration moyenne en acide lactique significativement plus faible que les fromages Non dél. et 41 g/kg car le lactose est devenu limitant avant le démoulage, mettant fin à la production d'acide lactique. En revanche, une quantité suffisante de lactose était présente dans les fromages Non dél. et 41 g/kg pour continuer l'acidification jusqu'au démoulage, amenant à la production de quantités d'acide lactique similaires. Entre le démoulage et le point à 48 h, les fabrications dé lactosées à 41 g/kg et 32 g/kg présentent de faibles évolutions de leur concentration en lactose, qui s'expliquent par les faibles concentrations en sucres résiduels à ce moment-là (0,78 et 0,16 g/kg). En revanche, la concentration en acide lactique dans les fromages Non dél. augmente significativement entre 24 h et 48 h, car des quantités plus importantes de sucres résiduels restaient dans les fromages au démoulage (2,44 g/kg). Ce résultat confirme que les fromages Non dél. ont post-acidifié tandis que les fromages 41 g/kg ont peu ou pas post-acidifié et les fromages 32 g/kg n'ont pas post-acidifié.

3.5 Lactocoques et leuconostocs

L'étude de l'impact du dé lactosage sur la dynamique d'acidification du fromage nécessite d'étudier l'évolution des bactéries lactiquesensemencées, les lactocoques et leuconostocs. En effet, l'acidification du fromage est due à la dégradation du lactose en acide lactique par les bactéries lactiquesensemencées, et l'étude de l'impact du dé lactosage sur l'acidification du fromage serait incomplète si l'évolution de leur population n'était pas prise en compte.

Les populations de ces bactéries sont similaires au démoulage (Tableau 24) et les évolutions présentées dans la Figure 47 ne montrent pas de différences significatives en fonction du niveau de dé lactosage.

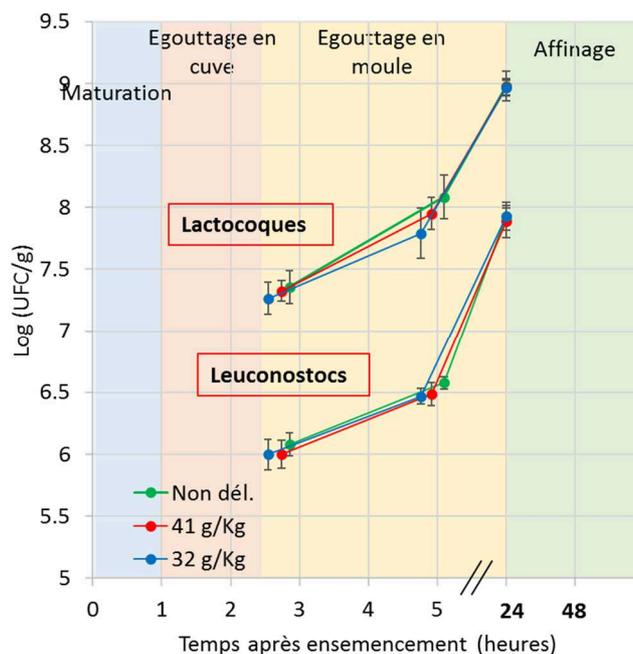


Figure 47 : Évolutions des populations de lactocoques et leuconostocs dans le caillé pendant la fabrication en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

L'absence de différences significatives de vitesse de croissance des bactéries lactiques s'explique par la disponibilité du lactose dans les fabrications jusqu'au démoulage. Au démoulage, l'obtention de teneurs en MS similaires explique l'obtention de valeurs d'aw similaires, qui ont permis une croissance identique des bactéries dans tous les fromages (Tableau 24). Ces résultats confirment que le dé lactosage n'affecte pas la croissance des bactéries lactiques ensemencées, en accord avec plusieurs études précédentes (Hou *et al.*, 2012; Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2004) mais également que l'affinage des fromages a débuté avec des niveaux de populations de bactéries lactiques similaires.

3.6 pH

Le pH est directement lié à la quantité d'acide lactique produite suite à la dégradation du lactose par les bactéries lactiques. Le dé lactosage ayant un impact important sur la concentration en lactose et par conséquent la concentration en acide lactique du fromage, il est important d'analyser les conséquences du dé lactosage sur le pH, qui affecte le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage.

Au démoulage, le pH des fromages 32 g/kg (pH 5,10) est significativement plus élevé que le pH des fromages Non dél. et 41 g/kg (pH 4,97) (Tableau 24). L'évolution du pH dans le lait, le

caillé et le fromage pendant la fabrication montre que ces différences apparaissent à partir du dé lactosage de la cuve, autour de 2 h (Figure 48). Au moment du dé lactosage, une hausse nette du pH est visible dans les caillés 32 g/kg mais les différences s'atténuent au moment du moulage. Après le moulage, la différence de pH entre le niveau 32 g/kg et le niveau Non dél. reste significative jusqu'au dé moulage, où la différence entre le pH des fromages 32 g/kg et celui des fromages Non dél. et 42 g/kg s'accroît.

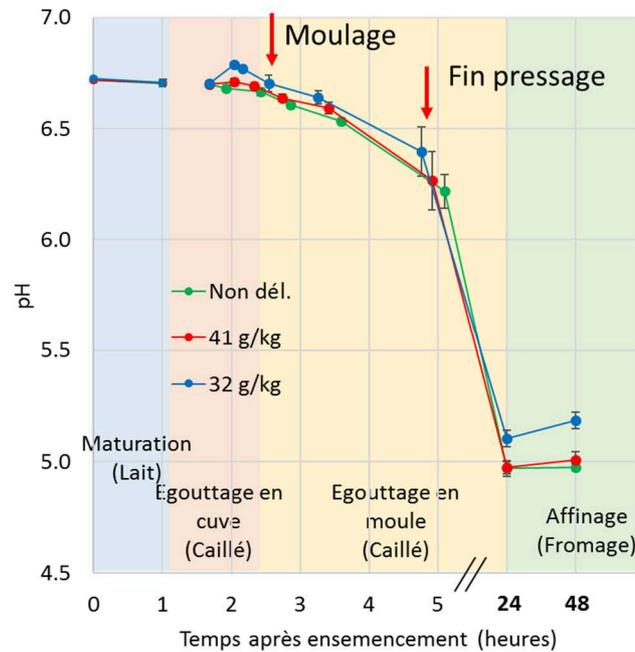


Figure 48 : Évolutions du pH du lait, du caillé tamisé et du fromage en début d'affinage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

L'augmentation du pH dans les caillés 32 g/kg à partir du dé lactosage (~2 h) peut s'expliquer par une dilution des protons présents dans leur LIG. En effet, pendant la fabrication, les concentrations en acide lactique similaires dans les trois niveaux montrent qu'il n'y a pas de différence d'acidification. Pendant la suite de l'égouttage, le pH diminue en fonction de l'acide lactique qui se concentre dans le fromage. Entre le début du dé lactosage (1,7 h) et le dé moulage, le pH diminue très peu car l'égouttage est rapide (l'augmentation la plus importante de l'ESD a lieu à ce moment-là) et l'acide lactique est éliminé. Le pH diminue ensuite plus rapidement après le moulage car l'égouttage ralentit et l'acide lactique se concentre dans le fromage. La différence de pH au dé moulage est fortement liée à la quantité d'acide lactique produite et donc à la quantité de sucres résiduels restante dans le caillé après le dé lactosage. Dans les fromages Non dél. et 41 g/kg, le lactose n'est pas limitant avant le

démoulage, donc des quantités d'acide lactique similaires ont été produites. En revanche, dans les fromages 32 g/kg, le lactose est limitant avant le démoulage, conduisant à des quantités d'acide lactique produites moins élevées et à un pH plus haut que dans les deux autres niveaux.

3.7 Calcium et phosphore

Les concentrations et l'état soluble ou associé aux caséines du calcium (Ca) et du phosphore (P) dans le fromage sont affectés par le pH. Il est intéressant d'étudier l'impact du délactosage sur la Ca car les variations de teneurs de ce minéral sont susceptibles d'affecter significativement les propriétés fonctionnelles du fromage. L'étude de l'impact du délactosage sur le P est intéressante car ce minéral contribue de manière importante à la capacité tampon du fromage.

Dans cette partie, les évolutions du Ca et du P seront analysées dans la totalité de l'échantillon et sous forme soluble, c'est-à-dire dans la phase aqueuse du lait, caillé et fromage, extraite par ultracentrifugation. Les minéraux totaux permettront d'estimer une éventuelle perte globale de ces minéraux tandis que les minéraux solubles permettront d'estimer l'ampleur de leur solubilisation et par conséquent la quantité de minéraux encore associés aux caséines.

3.7.1 Totaux

Les teneurs en Ca et P totaux des fromages au démoulage (exprimées par rapport à l'ESD) ne présentent pas de différences significatives entre les niveaux de délactosage (Tableau 24). La teneur en Ca total des fromages est autour de 2,7 g/100 g et celle en P total autour de 1,4 g/100 g.

Au cours de la fabrication, la teneur en Ca total du caillé par rapport à son ESD augmente pendant l'égouttage en cuve et le pressage, passant de ~1,9 % (1,7 h) à ~2,7 % à la fin du pressage (5 h) (Figure 49 (a)). À partir de la fin du pressage, le Ca total tend à diminuer légèrement jusqu'à 2,6 % à 48 h. Pendant l'égouttage en cuve, la teneur en Ca total des caillés 32 g/kg est significativement plus élevée que celle des caillés Non dél. puis cette différence s'atténue et disparaît à la fin du pressage.

L'augmentation de la teneur en Ca total/ESD pendant la fabrication s'explique par l'égouttage du caillé qui entraîne une perte de sa MS soluble tandis que le Ca est peu affecté car il est

majoritairement associé aux caséines. En outre, la différence significative pendant l'égouttage en cuve est due à une perte plus importante de MS soluble dans les caillés 32 g/kg qui sont fortement dé lactosés que dans les fabrications Non dél. À partir de la fin du pressage, le fromage s'acidifie et cela entraîne la solubilisation progressive du Ca associé aux caséines. Dans le même temps, le fromage s'égoutte encore légèrement avant le démoulage (1% de gain d'ESD entre 5 h et 24 h) et le salage entre 24 h et 48 h entraîne un complément d'égouttage. La solubilisation du Ca associé aux caséines, accompagné de ce complément d'égouttage entraîne une diminution de la teneur en Ca total.

Au cours de la fabrication, la teneur en P total du caillé dans l'ESD augmente pendant l'égouttage en cuve et pendant la première moitié du pressage, passant de ~1,3 % (1,7 h) à ~1,6 % autour de 3,5 h (Figure 49 (b)). Entre 3,5 h et 5 h, la teneur en P total tend à diminuer puis diminue significativement entre 5 h et 24 h, passant de ~1,6 % à ~1,4 %. Entre 24 h et 48 h la teneur en P total dans le fromage augmente de 1,4 % à 1,7 %.

Comme pour le Ca, l'augmentation de la teneur en P total pendant la fabrication reflète l'élimination de la MS soluble avec l'égouttage et par conséquent la concentration du P, majoritairement lié aux caséines. En fin d'égouttage en cuve, la teneur en P total/ESD des caillés 32 g/kg est significativement plus élevée que dans les autres niveaux à cause d'une plus grande quantité de MS soluble éliminée, puis cette différence s'atténue dès le moulage du caillé (~3 h). La diminution de la teneur en P total entre la fin du pressage et le démoulage peut s'expliquer par la solubilisation du P inorganique lié aux caséines sous l'effet de l'acidification du fromage. En revanche, l'augmentation de la teneur en P total entre 24 h et 48 h est difficilement explicable. Le complément d'égouttage créé par le salage du fromage a entraîné une diminution du Ca total par l'élimination de la part solubilisée, il est donc difficile d'expliquer pourquoi le P total se concentrerait dans le fromage à ce stade. La mesure des échantillons en fin de pressage, 24 h et 48 h a été renouvelée, mais les résultats sont restés inchangés. Ces résultats ont été comparés avec la littérature : un fromage de type Gouda-Edam voit sa teneur en phosphore augmenter pendant l'égouttage puis se stabiliser à une teneur entre 0,5 et 0,52 g/ 100 g de fromage jusqu'au démoulage, donnant un coefficient de récupération du P total entre 53 % et 54 % (Mietton *et al.*, 2004). Or, la concentration moyenne mesurée au démoulage dans nos fromages est de 0,38 g/100 g de fromage

(correspondant à environ 1,40 % P T/ESD ; Tableau 24) avec un coefficient de récupération moyen de 47 %. En revanche, le point à 48 h est plus proche de la littérature, avec une concentration moyenne de 0,45 g/100 g de fromage (correspondante à environ 1,70 % P T/ESD ; Figure 49) et un coefficient de récupération moyen de 57 %. Les fabrications ayant été randomisées, un problème de solubilisation du P total à cause d'un mauvais traitement ne serait pas survenu sur tous les fromages et aurait entraîné une variabilité importante dans les données. Ainsi, les 18 échantillons de chaque point de prélèvement ayant été préparés et dosés dans les mêmes conditions, il est probable que les résultats aient été faussés à ce moment-là. Les points fin pressage et 24 h sont ceux qui s'éloignent le plus des données de la littérature, et donc qui semblent les moins représentatifs de la réalité. La teneur en P total/ESD est donc probablement proche de la teneur que nous avons mesurée à 48 h.

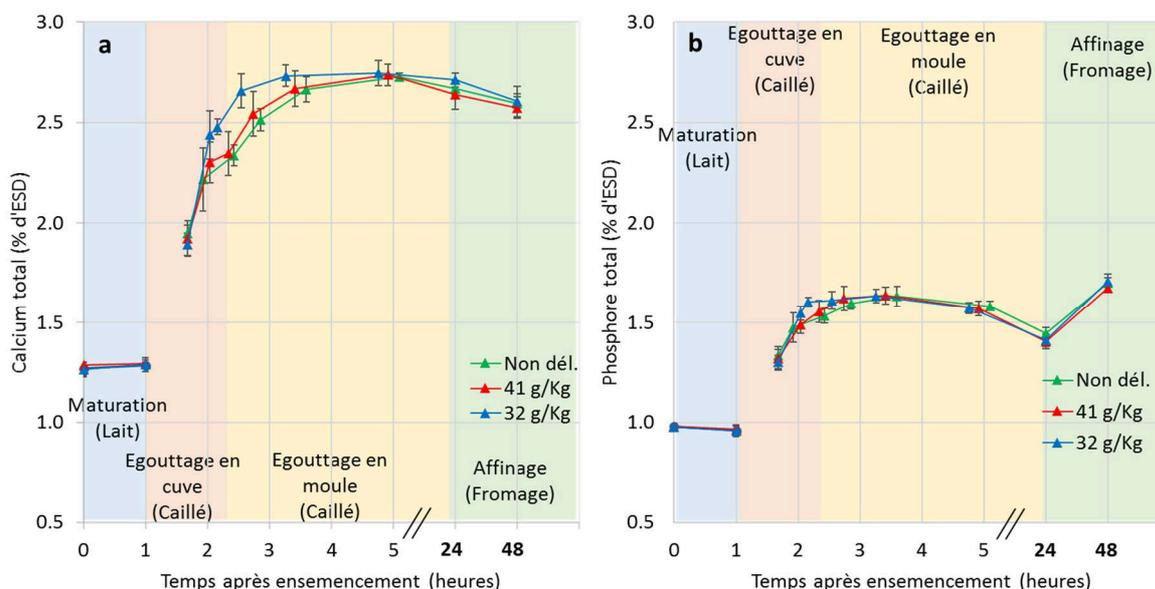


Figure 49 : Évolutions de la teneur en calcium total (a) et de la teneur en phosphore total (b) sur l'ESD en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

Le niveau de dé lactosage n'a pas augmenté la perte de Ca et P au cours de la fabrication. Ce résultat va à l'encontre des conclusions de van den Berg & de Vries (1975) qui observent une perte accrue des minéraux dans le lactosérum pendant la fabrication. Cela peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes, notamment par rapport à la vitesse d'acidification. Dans l'étude de van den Berg & de Vries (1975), le pH des fromages est de 5,8 (niveau d'ensemencement le plus faible) et 5,2 (niveau d'ensemencement le plus fort) 4 h après l'emprésurage, tandis que le pH des fromages dans notre étude au même moment (fin

pressage) est de 6,3. L'acidification étant plus rapide dans leur étude, les minéraux sont davantage susceptibles d'être solubilisés et la potentielle diminution du pouvoir tampon de la phase aqueuse par le dé lactosage a affecté leur vitesse de solubilisation. Dans notre étude, l'égouttage des fromages était presque terminé lorsque l'acidification était suffisamment importante pour entraîner la solubilisation des minéraux liés aux caséines. Le dé lactosage peut avoir un impact sur la solubilisation des minéraux liés aux caséines seulement si l'acidification est suffisamment importante pendant l'égouttage en cuve.

3.7.2 Solubles

Au démoulage les taux de Ca soluble par rapport au Ca total et de P soluble par rapport au P total sont significativement moins élevés dans les fromages 32 g/kg que dans les fromages Non dél. et 41 g/kg (Tableau 24). Dans les fromages 32 g/kg, le Ca soluble représente 38 % du Ca total et le P soluble représente 17 % du P total tandis que dans les fromages Non dél et 41 g/kg, le Ca soluble représente 47 % du Ca total et le P soluble représente 20 % du P total. Les évolutions du taux de Ca soluble par rapport au Ca total et du taux de P soluble par rapport au P total sont présentées dans la Figure 50.

Trente secondes avant dé lactosage (1,7 h), le Ca soluble représente 10 % du Ca total. Au cours de la fabrication, le taux de Ca soluble diminue jusqu'à ~3 % à la fin du pressage (5 h). Au cours de l'égouttage en cuve, le taux de Ca soluble des caillés 32 g/kg est significativement plus faible que celui des caillés Non dél. et 41 g/kg. Entre la fin du pressage et le démoulage (24 h), le taux de Ca soluble augmente fortement, de 2,5 % à la fin du pressage à 38 %-47 % au démoulage en fonction du niveau de dé lactosage. Entre 24 h et 48 h, le taux de Ca soluble n'évolue pas dans les trois niveaux de dé lactosage.

La diminution du taux de Ca soluble pendant la fabrication est due à l'égouttage et à l'élimination du Ca soluble avec le LIG. Les caillés 32 g/kg, les plus fortement dé lactosés, voient leur taux significativement plus bas en cuve à cause d'une élimination plus intense du Ca soluble du LIG. Entre la fin du pressage et le démoulage, l'augmentation importante du taux de Ca soluble reflète la solubilisation du Ca INSOL sous l'effet de l'acidification et de la diminution du pH. Le taux significativement plus bas dans les fromages 32 g/kg montre que l'acidification a solubilisé moins de Ca INSOL par rapport aux deux autres niveaux. Ce résultat est cohérent avec les concentrations en acide lactique mesurées à ce stade ainsi que les pH :

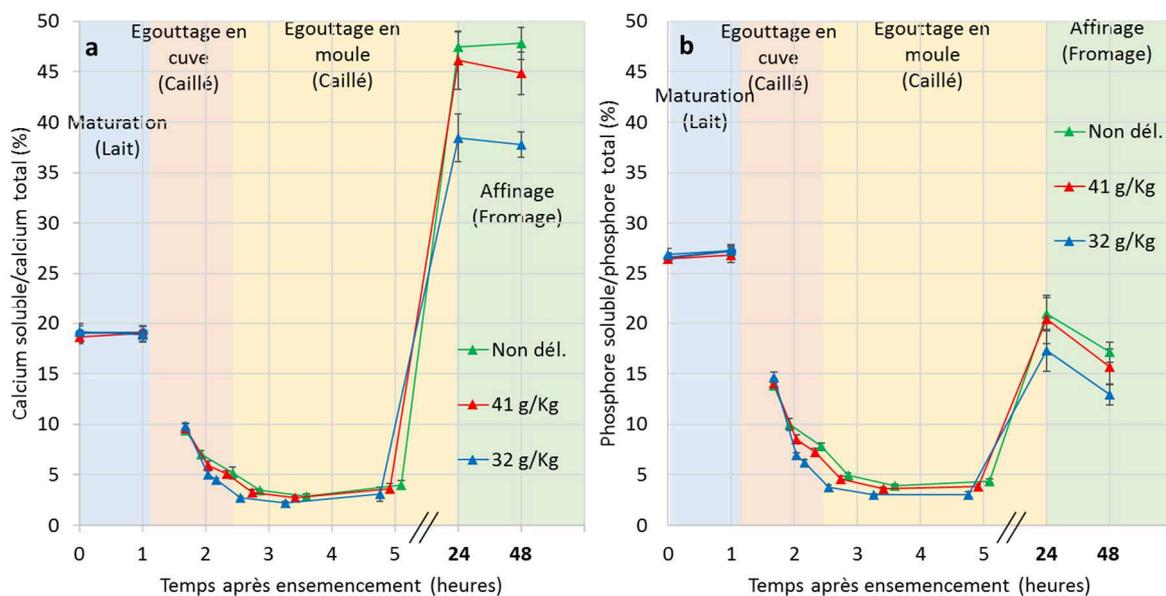


Figure 50 : Évolutions du taux de calcium soluble par rapport au calcium total (a) et du taux de phosphore soluble par rapport au phosphore total (b) en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

les fromages 32 g/kg se démarquaient des autres avec une concentration en acide lactique significativement plus faible et un pH significativement plus haut que les autres fromages au démoulage. Tous les fromages ayant une teneur en Ca total similaire, nous pouvons conclure qu'au démoulage, la matrice des fromages 32 g/kg contient davantage de Ca INSOL amenant potentiellement à des propriétés fonctionnelles différentes. La teneur en Ca INSOL des fromages au démoulage et à 48 h a été calculée et présentée dans le Tableau 24 afin d'être mise en lien ultérieurement avec les propriétés fonctionnelles du fromage.

L'évolution du taux de P soluble pendant la fabrication est similaire à l'évolution du taux de Ca soluble. Trente secondes avant dé lactosage (1,7 h), le P soluble représente 15 % du P total. Au cours de la fabrication, le taux de P soluble diminue jusqu'à ~3 % à la fin du pressage (5 h). Au cours de l'égouttage en cuve, le taux de P soluble des caillés 32 g/kg est significativement plus faible que celui des autres niveaux. Entre 5 h (fin du pressage) et 24 h, le taux de P soluble augmente de ~3 % à ~17 %-20 %. Entre 24 h et 48 h, le taux de P soluble diminue autour de ~13 %-17 % en fonction du niveau de dé lactosage.

Comme pour le Ca soluble, la diminution globale du taux de P soluble est due à l'égouttage tandis que la diminution accrue du P soluble des caillés 32 g/kg est due au niveau de dé lactosage plus intense. Entre 24 h et 48 h, l'augmentation du taux de P soluble est due à l'acidification qui entraîne une solubilisation du phosphore inorganique lié aux caséines. La

diminution du taux de P soluble entre 24 h et 48 h reflète l'anomalie identifiée dans les teneurs en P total, qui a permis de calculer le taux de P soluble. Les valeurs des points fin pressage et 24 h ayant été écartées car potentiellement erronées, les taux de P soluble de ces points doivent également être écartés.

3.8 Citrates

Les concentrations en citrates ne sont pas significativement différentes au démoulage entre les niveaux de délactosage (Tableau 24). Cependant l'étude de leurs évolutions au cours de la fabrication montre que la dilution les a affectées. L'impact du délactosage sur les citrates est susceptible d'affecter la production de molécules aromatiques suite à leur dégradation par les leuconostocs.

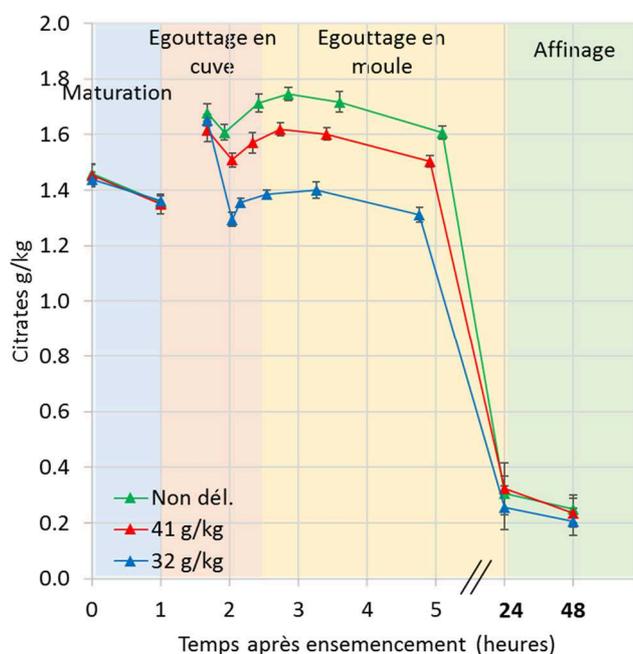


Figure 51 : Évolutions de la concentration en citrates dans le caillé en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.

L'évolution de la concentration en citrates dans le caillé montre un impact significatif du niveau de délactosage (Figure 51). Trente secondes avant délactosage (1,7 h), les concentrations en citrates sont similaires dans le caillé de toutes les fabrications. Le délactosage entraîne une diminution de la concentration en citrates dans le caillé et à 2 h : plus le niveau est élevé et plus la concentration en citrates dans le caillé à ce moment-là est faible. Entre 2 h et 3,5 h, la concentration en citrates dans le caillé augmente légèrement puis à partir de 3,5 h diminue jusqu'au démoulage. Entre 3,5 h et 24 h, les concentrations en

citrates diminuent de 1,3-1,6 g/kg jusqu'à 0,3 g/kg et les différences entre les niveaux ont disparu.

En diluant le LEG, le délactosage crée un déséquilibre des concentrations en citrates entre LIG et LEG, conduisant à une diffusion des citrates solubilisés dans le LIG vers le LEG, visible entre 1,7 h et ~2 h. L'augmentation de la concentration en citrates entre ~2 h et ~3 h pose question car on pourrait s'attendre à une diminution de la concentration en citrates avec l'égouttage du caillé. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une partie des citrates (~10 %) est liée aux caséines (Gaucheron, 2005) et donc non affectée par l'égouttage. En effet, à ~2h (point « après délactosage ») l'impact du délactosage sur l'équilibre des solutés est presque terminé, les solutés sont donc éliminés du caillé principalement par l'égouttage, et donc à la même vitesse que le LIG. Or, dans le cas des citrates, la partie associée aux caséines n'est pas affectée par l'égouttage, le LIG est donc exsudé plus rapidement que les citrates totaux, ce qui entraîne un effet de concentration des citrates dont l'évolution stagne pendant le pressage lorsque l'égouttage ralentit. À partir de ~3 h, la concentration en citrates diminue probablement à cause de sa dégradation par les bactéries citrates (+) et l'égouttage non achevé à ce moment-là entraîne l'élimination des citrates. Entre la fin du pressage et le démoulage, la diminution de la concentration en citrates est très probablement due à sa consommation par les leuconostocs, capables de dégrader les citrates. En effet une diminution aussi importante de la concentration en citrates a précédemment été observée en présence de bactéries lactiques citrates (+) tandis que la concentration restait stable dans les fromagesensemencés avec des bactéries citrates (-) (Yvon *et al.*, 2011). Au démoulage, les concentrations en citrates ne sont pas significativement différentes car ces derniers ont été dégradés en quasi-totalité. Les citrates ne peuvent donc pas être une variable explicative du pouvoir tampon du fromage au démoulage. Au total, seulement 20 % des citrates du lait ont été disponibles à la dégradation car ~80 % des citrates ont été retrouvés dans le lactosérum en fin de fabrication.

Le délactosage a un impact sur la concentration en citrates du fromage. Ainsi, Le délactosage ayant diminué la concentration en citrates, la quantité totale de citrates consommés par les bactéries lactiques entre 5 h et 24 h diminue avec le niveau de délactosage. Ce résultat suggère que la quantité de molécules aromatiques produite suite à la dégradation des citrates est potentiellement réduite.

3.9 Le pouvoir tampon

Le délactosage ayant potentiellement un impact sur les solutés et les minéraux, le pouvoir tampon peut être également affecté et ainsi modifier l'évolution du pH pendant l'affinage.

Des différences de pouvoir tampon du fromage ont été observées en fonction du niveau de délactosage (Tableau 24). Le pouvoir tampon sur la zone de pH 3-5,5 est significativement plus faible dans les fromages les plus délactosés (32 g/kg) que dans les fromages Non dél. et 41 g/kg (Figure 52). Cependant, les différences de pouvoir tampon ne sont pas les mêmes sur toute la zone de pH. La zone la plus affectée par le niveau de délactosage est la zone entre 3 et 4,5 avec un pic maximal à pH 3,5 : cette zone correspond au pKa des protéines sériques, citrates, lactates et des groupements carboxyles des caséines (Salaün, 2005). Sur la zone entre 4,5 et 5,5 le pouvoir tampon des fromages 32 g/kg est également significativement plus faible que les deux autres niveaux mais la différence est moins marquée (Figure 52). Cette zone correspond au pouvoir tampon des phosphates organiques des caséines micellaires. La zone entre pH 5,5 et 7 correspond au pouvoir tampon des phosphates inorganiques et aucune différence n'est significative sur cette zone (Figure 52).

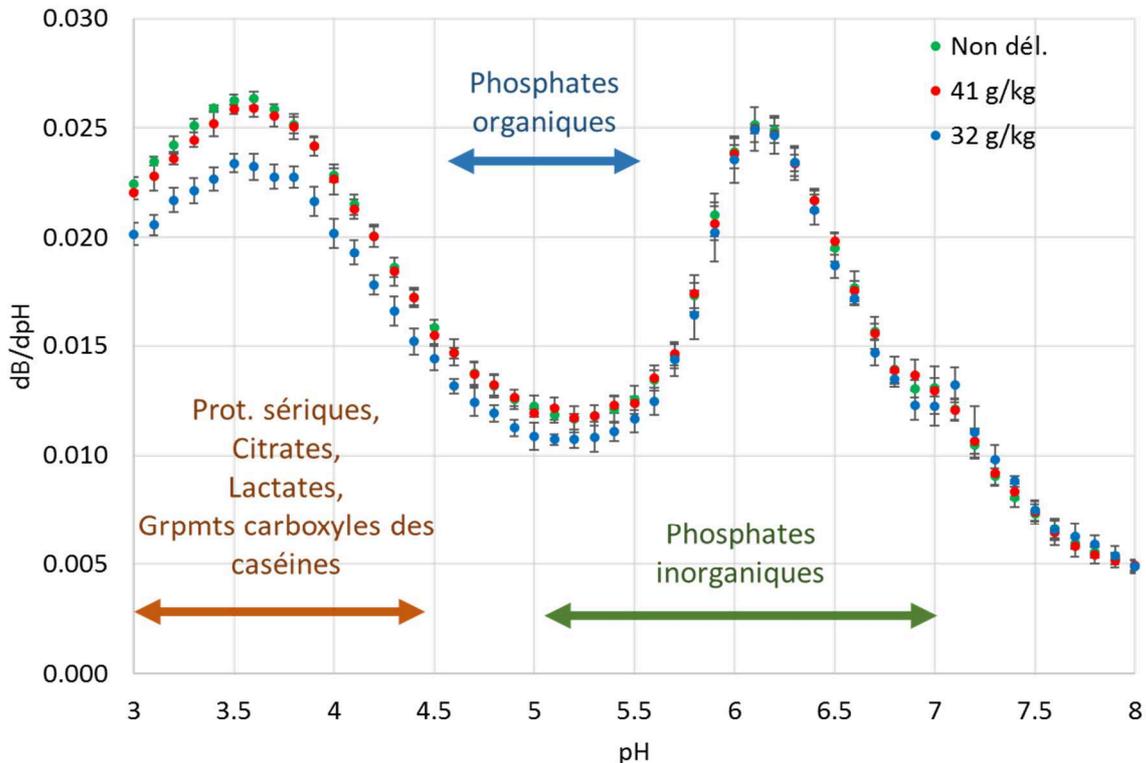


Figure 52 : Indice de pouvoir tampon (dB/dpH) en fonction du pH au cours de la titration des échantillons avec NaOH.

Le niveau de délactosage a diminué significativement la quantité de lactates dans le fromage, réduisant ainsi la capacité tampon liée à cette molécule. Le pouvoir tampon de la zone pH 3-4,5 est très fortement corrélé avec la concentration en acide lactique du fromage à ce stade avec $r=0,98$. Les protéines sériques n'ont pas été analysées mais il est probable que la dilution ait diminué leur concentration et par conséquent le pouvoir tampon lié à ces molécules sur cette zone de pH. Une différence plus faible mais statistiquement significative a été observée sur la zone de pH 4,5-5,5 correspondant au pKa du phosphate organique des caséines. Néanmoins, il est très peu probable que les paramètres de délactosage aient affecté le phosphore des groupements phosphosérine des caséines. Les zones affichées sur la Figure 52 sont des zones de pouvoir tampon maximales par rapport au pKa de certaines molécules, permettant d'orienter l'interprétation des résultats. Ainsi, la diminution du pouvoir tampon à pH 5 n'est que la partie visible de ce pic, dont la base pourrait se trouver aux alentours du pH 5. La diminution du pouvoir tampon lié aux lactates et probablement aux protéines sériques a donc pu diminuer le pouvoir tampon sur toute la zone entre pH 3 et pH 5. La zone entre pH 5-5,5 et pH 7, avec un pic à pH 6,1 correspond au pKa des phosphates de calcium formés avec le calcium et le phosphate inorganique liés aux caséines puis libérés lors de l'acidification de l'échantillon (Hassan *et al.*, 2004; Lucey *et al.*, 1993). Il n'y a pas de différence significative de pouvoir tampon en fonction du niveau de délactosage sur cette zone. Cette zone reflétant le pouvoir tampon lié au phosphore inorganique, ce résultat est cohérent avec l'absence de différences de teneurs en phosphore total dans le fromage (Tableau 24).

3.10 Indices de protéolyse et activités enzymatiques

Des impacts potentiels du délactosage sur les activités enzymatiques ont été rapportés dans la littérature. D'une part, l'augmentation du pH au démoulage suite au délactosage serait susceptible d'augmenter l'activité de la plasmine (Vélez *et al.*, 2016) ou de diminuer l'activité des protéases acides (Jaros *et al.*, 1997). D'autre part, le délactosage serait susceptible d'éliminer les inhibiteurs d'activateurs de plasminogène, activant ainsi le système plasmine/plasminogène (Vélez *et al.*, 2015). Pour vérifier ces hypothèses dans le cadre de notre étude, nous avons mesuré l'activité du système plasmine/plasminogène au démoulage ainsi que l'activité des protéases aspartiques acides (coagulant résiduel). Dans la perspective d'observer des différences de protéolyse en fin d'affinage, l'état protéolytique des fromages

au démoulage a été mesuré afin de confirmer d'éventuelles différences de vitesse de protéolyse.

Les activités protéasiques acides mesurées dans les fromages 32 g/kg au démoulage sont significativement plus faibles que celles des fromages Non dél. et 41 g/kg (Tableau 24). En revanche, aucune différence d'activité plasmine et plasminogène n'a été observée entre les niveaux de délactosage. Les indices de protéolyse primaire (NS/NT), secondaire (NPN/NT) et de la part de protéolyse secondaire par rapport à la protéolyse primaire (NPN/NS) sont similaires dans les trois niveaux (Tableau 24).

La diminution des activités protéasiques acides peut s'expliquer par une élimination du coagulant résiduel par le délactosage. L'absence de différence d'activité du plasminogène dans notre étude peut s'expliquer par les différences de paramètres technologiques par rapport à l'étude de Vélez *et al.* (2015) où avait été rapportée une diminution de l'activité du plasminogène au démoulage en lien avec le délactosage ayant entraîné son activation pendant la fabrication. En effet, l'activation du plasminogène est régulée en partie par les inhibiteurs de ses activateurs, mais également par la température, dont une augmentation suffisante pendant la fabrication peut l'activer (Ardö *et al.*, 2017). Dans l'étude de Vélez *et al.* (2015) les fromages délactosés étaient chauffés à 45 °C tandis que la température de chauffage dans nos fabrications n'était pas aussi élevée (35 °C).

L'absence de différence des indices de protéolyse indique que les différences éventuelles de niveaux de protéolyse observées dans les fromages affinés se seront développées au cours de l'affinage.

3.11 Rhéologie

Des mesures de module de déformabilité, contrainte, énergie à la fracture et déformabilité à la fracture ont été réalisées sur les fromages à la fin du pressage (Tableau 24). Aucun impact significatif du délactosage sur les propriétés rhéologiques du fromage à ce stade n'a été observé.

Cette absence d'impact significatif montre qu'à ce stade, l'organisation de la matrice du fromage n'est pas affectée par le délactosage. En effet, à la fin du pressage le pH encore élevé

(~pH 6,3) et les faibles concentrations d'acide lactique (similaires d'un niveau à l'autre) n'ont pu entraîner qu'une faible solubilisation des minéraux associés aux caséines.

3.12 Microstructure

La microstructure des fromages a été analysée au 5^{ème} jour d'affinage pour étudier l'impact des paramètres de fabrication sur l'organisation de la matrice au plus proche de l'étape de démoulage.

Le réseau protéique (vert) et la matière grasse (rouge) sont présentés dans la Figure 53. La matrice protéique est similaire pour tous les fromages : des petites hétérogénéités sont visibles (vert sombre) et des cavités (noir ou vert très sombre) contenant du lactosérum. Le niveau de délactosage n'a pas eu d'impact visible sur le réseau protéique des fromages à ce stade, mesuré par microscopie confocale. En revanche, des différences de taille et de forme des globules gras (rouge) ont été observées (Figure 54). Les globules gras des fabrications LS>E ont globalement une forme plus diffuse que les globules gras des fabrications LS=E et leur taille semble également plus hétérogène, avec un plus grand nombre de « gros » globules gras. En effet, l'analyse d'image a permis de mesurer les tailles individuelles de chaque globule gras qui ont été classés par ordre croissant en fonction de leur surface. Le 3^e quartile (les 25 % des globules gras ayant la surface la plus importante) correspondant à chaque combinaison de paramètres de délactosage est présenté dans la Figure 55. Les données de cette figure montrent que le 3^e quartile des fabrications Non dél., 41 g/kg LS=E et 32 g/kg LS=E représente environ 65 %-70 % de la surface totale occupée par la MG tandis qu'il représente environ 80 % de la MG dans les fabrications 41 g/kg LS>E et 32 g/kg LS>E. Le mode de délactosage a donc un impact plus important sur la taille des globules gras que le niveau de délactosage.

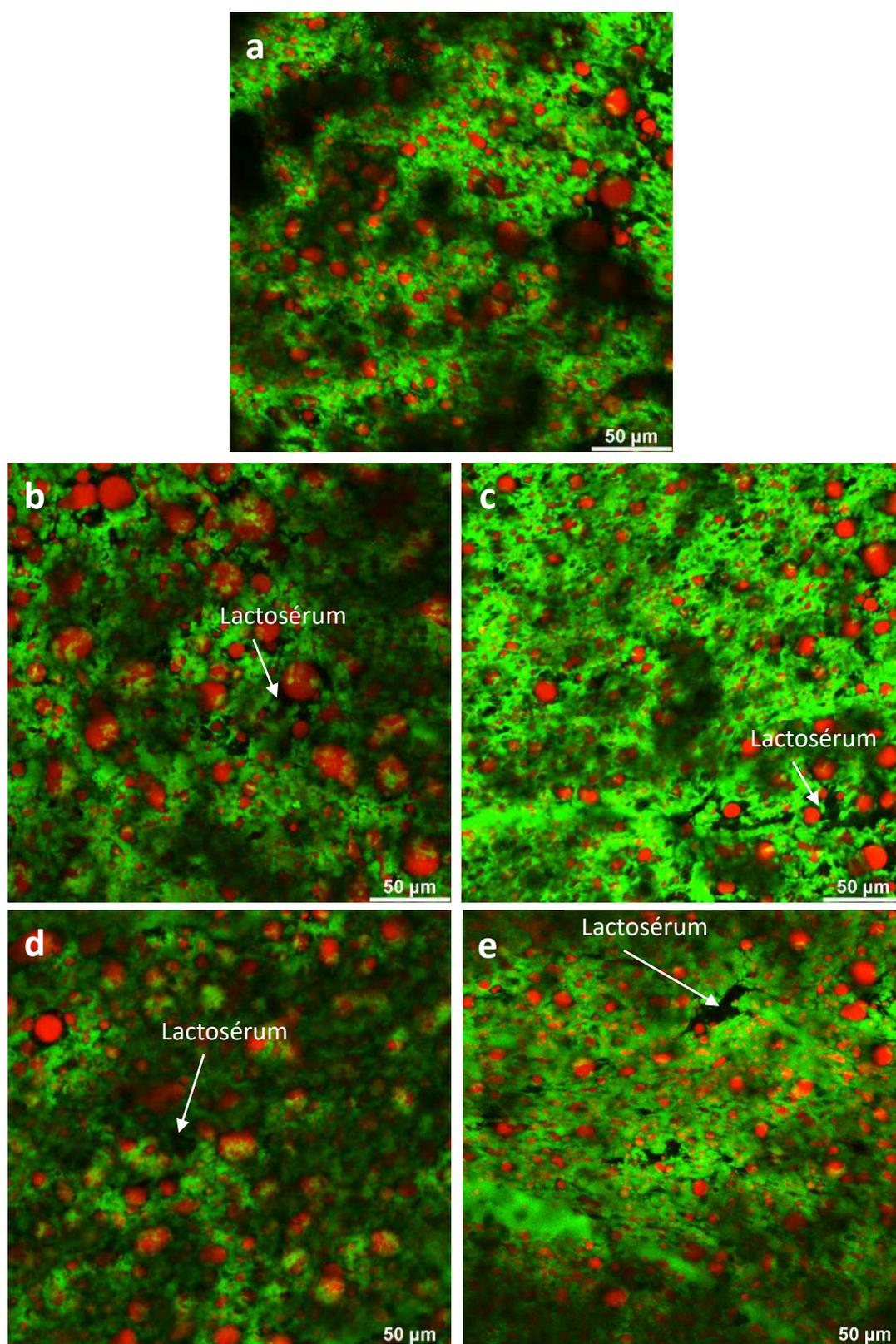


Figure 53 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non déli. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 5 jours d'affinage présentant les protéines codées en vert et la matière grasse codée en rouge.

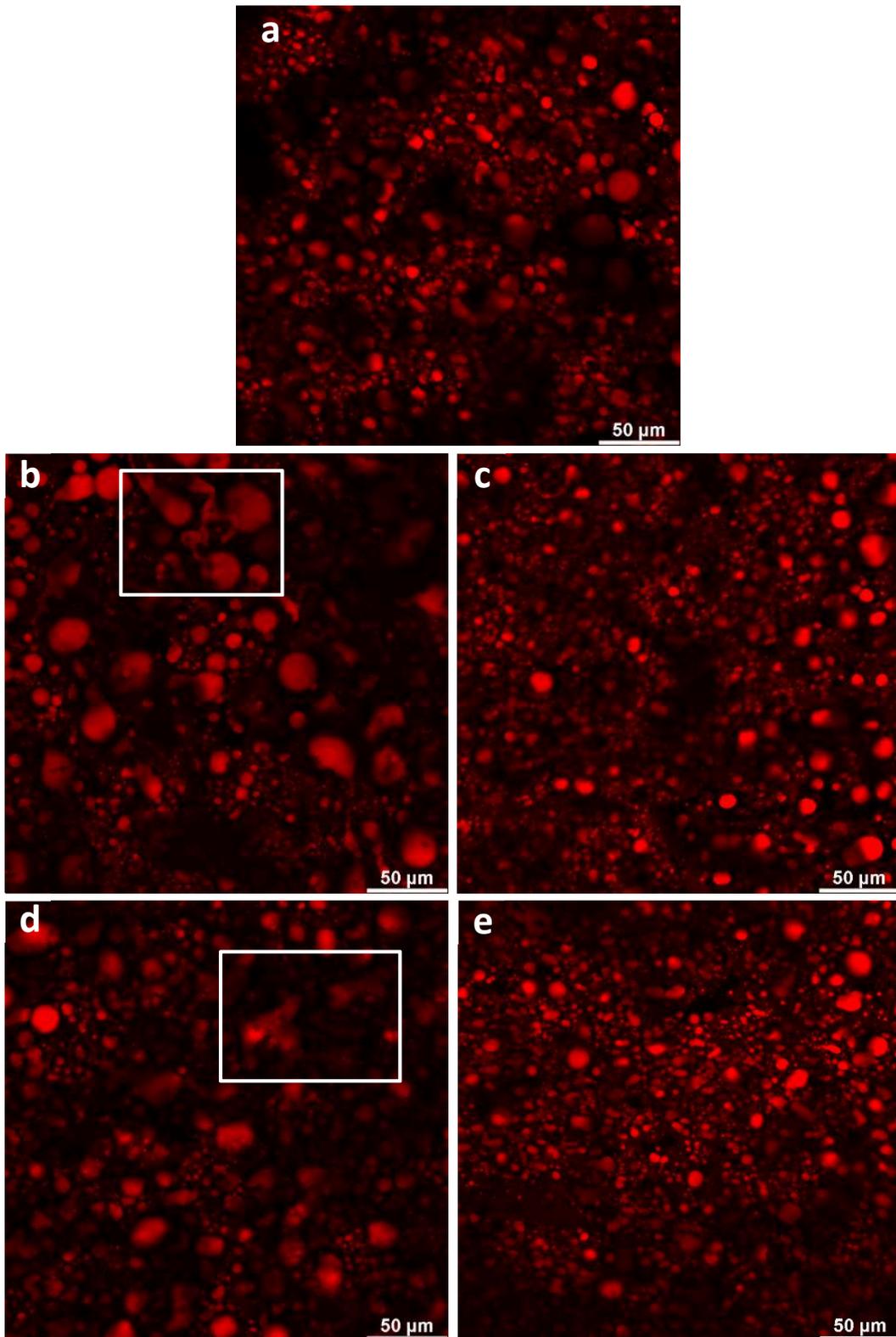


Figure 54 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non déli. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 5 jours d'affinage (MG en rouge, éléments encadrés = globules gras coalescents).

La forme diffuse des globules gras et leur plus grande taille sont dues à une rupture de leur membrane lipoprotéique qui préserve leur intégrité (Lopez et al., 2007). Les globules gras ayant leur membrane rompue s'agrègent et deviennent coalescents, c'est-à-dire qu'ils fusionnent pour former une masse de MG plus importante. Cette perte d'intégrité d'une partie des globules gras dans les fabrications LS>E peut s'expliquer par l'augmentation des contraintes mécaniques en cuve liées à ce mode de dé lactosage. En effet, le retrait d'une partie plus importante de lactosérum que d'eau

ajoutée augmente la densité du caillé dans le mélange caillé-lactosérum et donc les contraintes mécaniques entre les grains et avec les brassoires. De plus, le retrait du lactosérum nécessitait un court arrêt du brassage pendant lequel le caillé se déposait au fond de la cuve. Le mode LS>E a pu favoriser l'agglomération du caillé au fond de la cuve par rapport au mode LS=E en réduisant la quantité de lactosérum séparant les grains de caillé. Ainsi, la remise en suspension des grains agglomérés a pu les forcer à se séparer, en altérant leur intégrité.

3.13 Rendements

Nous avons observé avec les précédents résultats que la variation du niveau de dé lactosage entraîne l'élimination de différentes quantités de solutés qui peuvent affecter le rendement fromager. Les rendements et coefficients de récupération moyens de l'ESD et de la MG des fabrications sont présentés dans le Tableau 25.

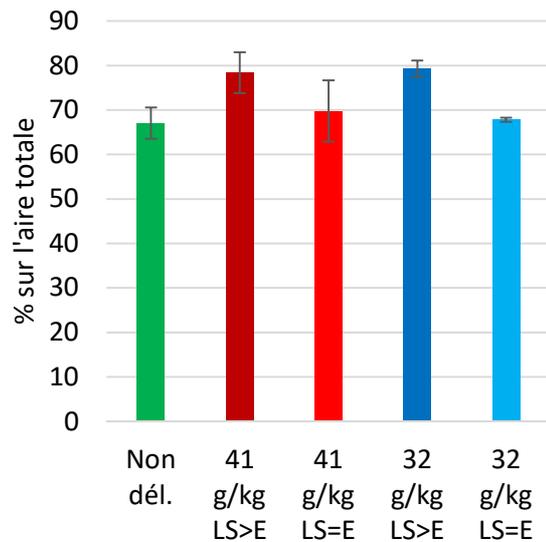


Figure 55 : Surface occupée par les globules gras les plus gros (3e quartile) par rapport à la surface de MG totale mesurée sur les images de microscopie confocale (3 images analysées par modalité présentée en Annexe 14).

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Tableau 25 : Rendements et coefficients de récupération pour chaque niveau et chaque mode de dé lactosage.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
Rendements corrigés (MS 52 %)	*	12,49 ^a	12,23 ^b	12,10 ^b	N.S.	12,00 ^a	12,33 ^a
Rendements corrigés (ESD 27 %)	*	11,87 ^a	11,73 ^{ab}	11,36 ^b	N.S.	11,36 ^a	11,73 ^a
Coefficient de récupération ESD (%)	*	34,68 ^a	34,09 ^{ab}	33,27 ^b	N.S.	33,18 ^a	34,19 ^a
Coefficient de récupération MG (%)	*	92,60 ^a	90,37 ^b	91,30 ^{ab}	*	90,08 ^a	91,59 ^b

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage ($P < 0,05$).

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

Les rendements corrigés et coefficients de récupération ont été affectés par le dé lactosage. Le niveau de dé lactosage a entraîné une diminution des rendements corrigés avec une différence significative entre les niveaux Non dél. et 32 g/kg. L'impact du niveau de dé lactosage sur la MS est également visible sur son coefficient de récupération qui diminue également lorsque le niveau augmente. Le coefficient de récupération de la MG a également été affecté par le niveau, avec une différence significative entre les fabrications Non dél. et 41 g/kg, et par le mode avec une différence significative entre LS>E et LS=E. Le dé lactosage affecte les rendements d'EST et d'ESD par l'élimination des composés solubles de la phase aqueuse du caillé, principalement le lactose, qui représente 40 % de la MS du lait (Snappe *et al.*, 2010). L'impact du dé lactosage sur le coefficient de récupération de la MG est lié au mode de dé lactosage. Le mode LS>E entraîne une diminution de la récupération de la MG des fabrications par rapport au mode LS=E. Ainsi, la récupération de la MG est moins élevée dans les niveaux 41 g/kg et 32 g/kg par rapport au niveau Non dél. car celui-ci n'a pas subi de dé lactosage pouvant entraîner la perte de MG. Cependant, il est important de noter que si la différence est significative entre les modalités LS>E et LS=E, les différences ne sont plus significatives lorsque le niveau et le mode sont croisés. En d'autres termes, il n'y a pas de différence significative de récupération de MG entre 41 g/kg LS>E et 41 g/kg LS=E, ni entre 32 g/kg LS>E et 32 g/kg LS=E. L'impact du mode sur la récupération de la MG est donc davantage une tendance. Cet impact sur la MG peut s'expliquer par des contraintes mécaniques plus importantes exercées sur le caillé avec le mode LS>E. Ainsi lors de nos fabrications (310 L de

lait), la différence de quantité de MG récupérée entre les fabrications LS>E (teneur moyenne en MG du lait = 35,18 g/L) et les fabrications LS=E (teneur en moyenne en MG du lait = 35,32 g/L) est d'environ 200 g. Bien que le mode LS>E ait entraîné une diminution de la récupération de la MG à l'échelle de la fabrication, la différence avec LS=E n'a pas été assez importante pour créer une différence significative de teneur en MG des fromages.

Dans la perspective d'optimiser économiquement l'étape de dé lactosage, les quantités d'eau utilisée et de lactosérum produit en fin de fabrication ont été analysées (Figure 56). Le niveau et le mode de dé lactosage créent des différences de quantité d'eau utilisée et par conséquent de quantités de lactosérum à prendre en charge en fin de fabrication. Les quantités d'eau ajoutée (Figure 56 (a)) et de lactosérum produit en fin de fabrication (Figure 56 (b)) sont plus importantes entre les niveaux que d'un mode à l'autre. Pour un même niveau, la différence de quantités de lactosérum produit entre les deux modes est proportionnelle à la différence de quantité d'eau ajoutée. Le mode LS>E génère une diminution de la quantité d'eau consommée ainsi que de la quantité de lactosérum produit par rapport au mode LS=E dans les niveaux 41 g/kg et 32 g/kg.

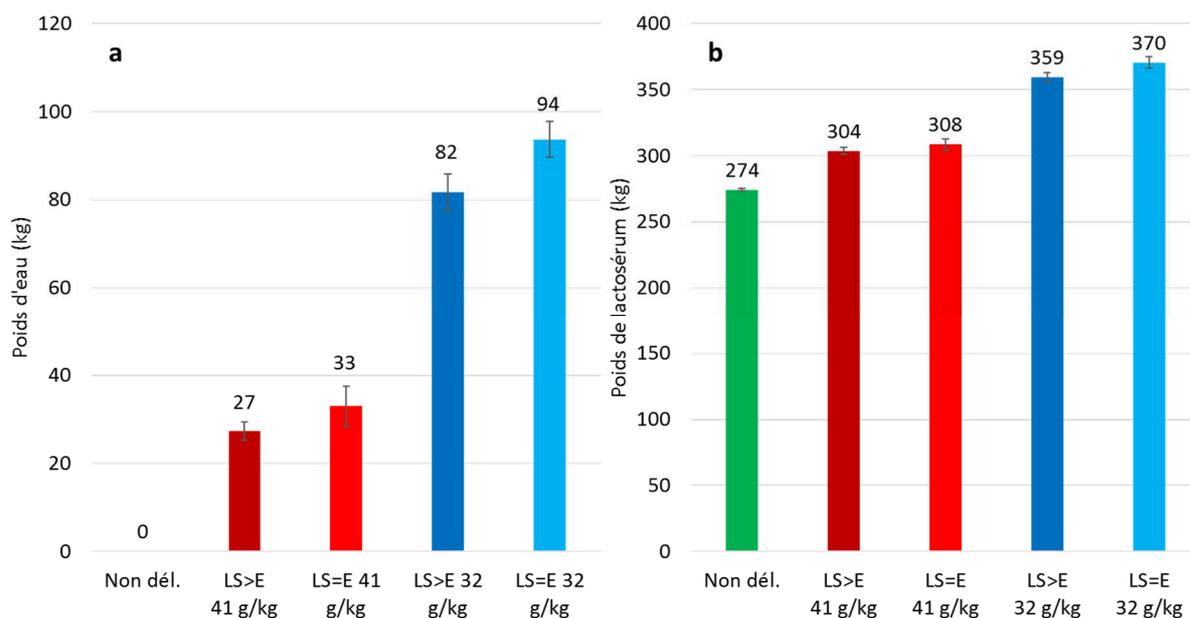


Figure 56 : Quantités moyennes d'eau ajoutée pour le dé lactosage (a) et quantités moyennes calculées de lactosérum produit (b) dans chaque fabrication (~310 L de lait) en fonction des paramètres de dé lactosage.

L'objectif principal de l'ajustement du niveau de délactosage étant le contrôle du développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage, une optimisation économique est donc envisageable en ajustant le mode de délactosage.

4 Impact du délactosage sur la composition et la structure du fromage affiné

4.1 Introduction

La composition, le pH, l'état protéolytique et les niveaux de populations bactériennes des fromages affinés dépendent des réactions physico-chimiques, biochimiques et microbiologiques qui se déroulent dans le fromage pendant son affinage. Les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné étant fortement liées à ces variables, il est nécessaire d'étudier l'impact que le délactosage a pu avoir sur elles dans un premier temps pour expliquer le développement de ces propriétés. Les caractéristiques physico-chimiques, les indices de protéolyse et les populations de bactéries lactiques des fromages en fin d'affinage sont présentés dans le Tableau 26.

Aucune différence significative n'a été observée en fin d'affinage entre les modes de délactosage sur les différentes caractéristiques des fromages affinés (Tableau 26). Les impacts du niveau de délactosage seront décrits dans les paragraphes suivants.

Tableau 26 : Caractéristiques physico-chimiques, indices de protéolyse et niveaux de populations bactériennes des fromages en fin d'affinage (n=6).

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
EST (%)	N.S.	53,40 ^a	53,79 ^a	53,60 ^a	N.S.	53,83 ^a	53,56 ^a
MG (%)	N.S.	26,93 ^a	27,01 ^a	26,97 ^a	N.S.	27,02 ^a	26,96 ^a
G/S (%)	N.S.	50,43 ^a	50,23 ^a	50,31 ^a	N.S.	50,20 ^a	50,34 ^a
ESD (%)	N.S.	26,47 ^a	26,77 ^a	26,63 ^a	N.S.	26,81 ^a	26,60 ^a
HFD (%)	N.S.	63,77 ^a	63,31 ^a	63,53 ^a	N.S.	63,25 ^a	63,58 ^a
MAT (%)	N.S.	23,85 ^a	23,97 ^a	24,30 ^a	N.S.	24,17 ^a	24,10 ^a
NaCl/H ₂ O (%)	N.S.	2,13 ^a	2,11 ^a	2,15 ^a	N.S.	2,12 ^a	2,13 ^a
pH	***	5,03 ^a	5,26 ^a	6,24 ^b	N.S.	5,74 ^a	5,76 ^a
Lactocoques (UFC/g)	S.	6,1 x 10 ^{6 a}	1,3 x 10 ^{7 b}	3,5 x 10 ^{7 c}	N.S.	2,4 x 10 ^{7 a}	2,3 x 10 ^{7 a}
Leuconostocs (UFC/g)	S.	3,1 x 10 ^{6 a}	1,1 x 10 ^{7 b}	9,6 x 10 ^{6 b}	N.S.	1,3 x 10 ^{7 a}	7,5 x 10 ^{6 a}
LBHF (UFC/g)	N.S.	4,7 x 10 ^{7 a}	3,4 x 10 ^{7 a}	2,6 x 10 ^{7 a}	N.S.	3,0 x 10 ^{7 a}	3,0 x 10 ^{7 a}
NS/NT (%)	***	23,96 ^a	24,02 ^a	27,73 ^b	N.S.	25,88 ^a	25,87 ^a
NPN/NT (%)	***	13,52 ^a	14,13 ^a	15,70 ^b	N.S.	14,77 ^a	15,06 ^a
NPN/NS (%)	N.S.	56,57 ^a	58,85 ^a	56,69 ^a	N.S.	57,23 ^a	58,31 ^a
Caséines α-S1 (% AR)	***	1,60 ^a	0,60 ^b	0,14 ^c	N.S.	0,77 ^a	0,66 ^a
Caséines α-S2 (% AR)	**	0,81 ^a	0,20 ^{ab}	0,00 ^b	N.S.	0,00 ^a	0,20 ^a
Caséines β (% AR)	***	10,30 ^a	7,60 ^b	1,79 ^c	N.S.	4,96 ^a	4,42 ^a
Caséines κ (% AR)	N.S.	3,57 ^a	2,97 ^a	2,42 ^a	N.S.	3,41 ^a	1,98 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage (P < 0,05).

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001.

S. : Différence significative de niveaux de populations bactériennes entre plusieurs niveaux de dé lactosage ou plusieurs modes (détermination des différences détaillée dans le Chapitre 2, partie 3.3)

% AR : % d'aire relative du pic par rapport à l'aire total du chromatogramme.

4.2 Matière sèche et matière grasse

Il a été nécessaire de confirmer qu'aucune différence de teneurs en matière sèche et en matière grasse ne soit significative en fin d'affinage car ces paramètres jouent un rôle important dans les propriétés fonctionnelles de la matrice.

En fin d'affinage, la teneur en MS de tous les fromages a augmenté, passant de teneurs entre 51,5 et 52,5 à des teneurs autour de 53,5 (Tableau 26). Comme au démoulage, les teneurs en MS en MG et en MAT sont similaires entre les niveaux.

L'augmentation des teneurs en MS des fromages entre le démoulage et l'affinage reflète la freinte (perte d'humidité et de matière qui y est solubilisée) suite au salage des fromages. L'absence de différences significatives de teneur en MS et MG nous permet de conclure que d'éventuelles différences d'activités enzymatiques et de vitesses de protéolyse ne peuvent pas être dues à des différences d'humidité. En outre, d'éventuelles différences dans les propriétés fonctionnelles ne peuvent pas être dues à des différences de teneurs en protéines ou en MG.

4.3 pH

Le pH est une variable essentielle pour comprendre le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles via son impact sur la répulsion électrostatique entre les protéines de la matrice. Il module également les activités enzymatiques et par conséquent la vitesse de protéolyse de la matrice du fromage.

Des valeurs de pH significativement différentes ont été mesurées en fin d'affinage entre les fromages 32 g/kg (pH 6,24) d'une part et les fromages Non dél. et 41 g/kg (pH 5,03 et 5,26) d'autre part (Figure 57). Les fabrications Non dél. semblent être restées à pH 5,0 tout au long de l'affinage tandis que les fromages 32 g/kg présentent une augmentation de 1 point de pH entre le démoulage et la fin de l'affinage. Cette augmentation est lente les 30 premiers jours puis plus rapide les 30 derniers jours. Le pH des fromages 41 g/kg a augmenté lentement, de manière assez homogène pendant l'affinage, pour atteindre un pH moyen de 5,2 au bout de 60 jours, restant relativement proche de celui des fabrications Non dél.

Dans les fromages 32 g/kg, l'augmentation du pH est la plus rapide car moins de lactates ont été produits, le fromage a donc été moins acidifié d'un côté mais également moins tamponné de l'autre. Ainsi, lorsque des molécules alcalines ont été libérées dans la matrice par la protéolyse, le pH a pu augmenter rapidement. Dans les fromages Non dél., une post-acidification a été observée, suggérant que le pH de ces fromages a pu diminuer davantage entre 48 h et 30 jours car des quantités significatives de sucres résiduels étaient encore présentes dans les fromages à 48 h. Ainsi, une grande quantité de protons a été libérée dans la matrice, associée à un pouvoir tampon plus élevé que dans les fromages 32 g/kg dû à de plus grandes concentrations en lactates, qui ont ralenti l'augmentation du pH au début de l'affinage. Dans les fromages 41 g/kg, le pH a tendance à augmenter plus rapidement que dans

les fromages Non dél. car moins de lactates ont été produits. Cependant, ces fromages étaient également très tamponnés et cela a ralenti l'augmentation de leur pH au cours des 30 premiers jours. Ce résultat montre que le niveau 41 g/kg a également entraîné une post-acidification, malgré la diminution de la concentration en lactose. En effet, le pH de ces fromages en fin d'affinage est en moyenne de 5,2, qui est le pH attendu au démoulage. Or, une augmentation significative du pH est attendue pendant l'affinage pour permettre la protéolyse et donc le développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles.

Dans les fromages 32 g/kg, l'augmentation du pH s'est accélérée à partir de 30 jours, contrairement aux fromages Non dél. et 41 g/kg. Cela s'explique par un pH plus élevé à ce moment-là (pH 5,5 en moyenne contre pH 5,0-5,1) qui a pu accélérer les activités protéolytiques de certaines enzymes et des bactéries lactiques et ainsi la libération de molécules alcalines provenant de la protéolyse telles que l'ammoniaque.

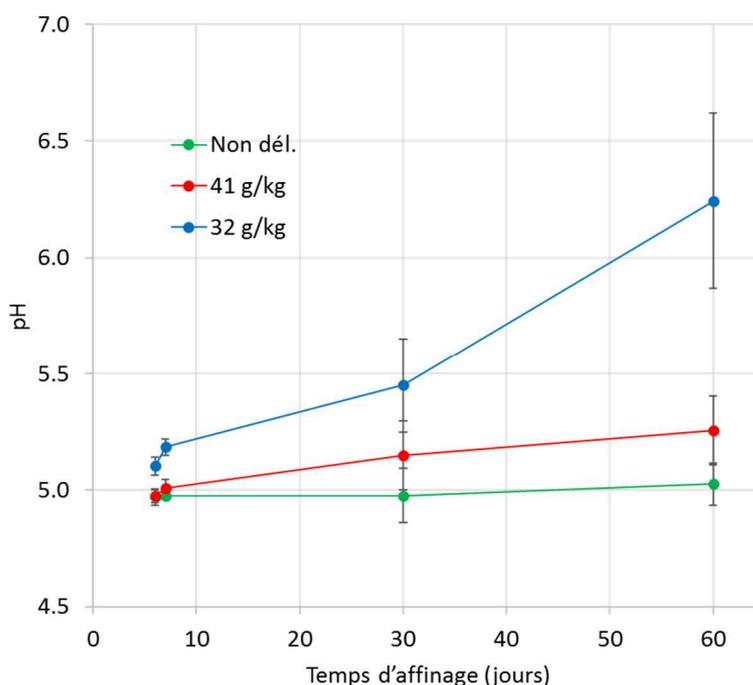


Figure 57 : Évolution du pH en fonction du niveau de dé lactosage et en fonction du temps d'affinage à partir du démoulage.

L'évolution du pH au cours de l'affinage peut donc s'expliquer par plusieurs facteurs mesurés dans cette étude. Premièrement, la concentration en acide lactique dans le fromage au démoulage est représentative de la quantité de protons libérés dans la matrice. Deuxièmement, la concentration en sucres résiduels (lactose + galactose + glucose) au

démoulage joue un rôle car elle représente la quantité d'acide lactique pouvant potentiellement être produite pendant l'affinage. Enfin, l'évolution du pH est déterminée par la capacité de la matrice à tamponner les protons. Le Tableau 27 montre que le pH en fin d'affinage est négativement corrélé avec ces trois variables au démoulage avec une p-value < 0,001. Les sucres résiduels sont moins corrélés avec le pH fin affinage car une grande majorité de la dégradation des sucres a été réalisée avant démoulage.

Tableau 27 : Corrélations de variables mesurées au démoulage avec le pH en fin d'affinage.

Variable	Capacité tampon (zone de pH 3,0 à pH 5,5) au démoulage	Sucres résiduels (Lactose + galactose + glucose) au démoulage	Acide lactique au démoulage
pH fin affinage	-0,90 ***	-0,75 ***	-0,90 ***

N.S. = non significatif, * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001.

Sur la base de ces corrélations, un modèle d'équation a été calculé par PLS permettant de prédire le pH en fin d'affinage :

$$\text{pH en fin d'affinage} = 11,52 - 7,99*[\text{PT } 3,0 \rightarrow 5,5] - 0,16*[\text{Sucres résiduels}] - 1,29 \times 10^{-4} * [\text{Acide lactique}] \quad (R^2 = 0,81, \text{ RMCE} = 0,27)$$

L'explication de l'évolution du pH et sa prédiction par ces trois variables sont étroitement liées à notre stratégie expérimentale qui a induit la variation de ces variables en particulier. Cependant, dans d'autres conditions et avec la variation d'autres paramètres, d'autres variables pourraient s'ajouter à l'explication et améliorer le modèle de prédiction, telles que la composition de la microflore bactérienne, l' a_w du fromage, la concentration en NaCl de la phase aqueuse, etc.

4.4 Populations bactériennes

La microflore du fromage participe au développement des propriétés sensorielles en prenant part à l'activité protéolytique, par la libération d'enzymes suite à la lyse cellulaire ou par les enzymes fixées sur leur paroi. Elle y participe également par la libération de molécules aromatiques issues de fermentations secondaires. Les bactéries hétérofermentaires telles que les leuconostocs sont impliquées dans ces mécanismes ainsi que les bactéries non ensemencées, comme par exemple les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LBHF).

Les niveaux de population de lactocoques sont significativement différents entre les 3 niveaux de délactosage avec $6,1 \times 10^6$, $1,3 \times 10^7$ et $3,5 \times 10^7$ ufc/g dans les fromages Non dél, 41 g/kg et 32 g/kg, respectivement (Tableau 26). Les niveaux de populations de leuconostocs sont significativement différents entre les fromages Non dél. et les fromages délactosés avec, respectivement, $3,1 \times 10^6$ et environ $1,0 \times 10^7$ (Tableau 26). La Figure 58 (a) montre que la décroissance des populations de lactocoques est similaire entre les trois niveaux jusqu'à 30 jours d'affinage, mais au cours des 30 derniers jours, la population des fromages 32 g/kg diminue plus lentement que celle des fromages 41 g/kg, elle-même plus lente que celle des fromages Non dél. Bien que les populations des fromages Non dél. et 41 g/kg soient significativement différentes, ces deux populations sont proches, par rapport à celle des fromages 32 g/kg qui se démarque nettement (Figure 58 (a)). Dans le cas des leuconostocs, les différences de populations apparaissent également à 30 jours d'affinage mais seule la décroissance des populations des fromages Non dél. n'est pas ralentie (Figure 58 (b)). En revanche, les LBHF ont des niveaux de population similaires dans tous les fromages (Tableau 26).

Il est reconnu que les bactéries lactiques acidifiantes se développent préférentiellement à pH neutre (Hutkins & Nannen, 1993). Les différences de pH entre les niveaux contribuent donc probablement de manière importante aux différences de vitesse de la diminution des populations de bactériesensemencées. En effet, les fromages Non dél., qui sont les plus acides présentent les diminutions les plus importantes de leurs populations de lactocoques et leuconostocs. De plus, la stabilisation des populations de lactocoques des fromages 32 g/kg entre 30 jours et 60 jours peut refléter l'augmentation importante du pH de ces fromages dans ce laps de temps. Les lactocoques participant aux activités protéolytiques du fromage pendant l'affinage, des différences de population de ces bactéries peuvent entraîner des différences de niveaux de protéolyse en fin d'affinage. Le niveau de délactosage n'ayant pas eu d'impact sur les populations de LBHF, ces bactéries ne sont pas une potentielle variable explicative des différences de propriétés sensorielles des fromages affinés.

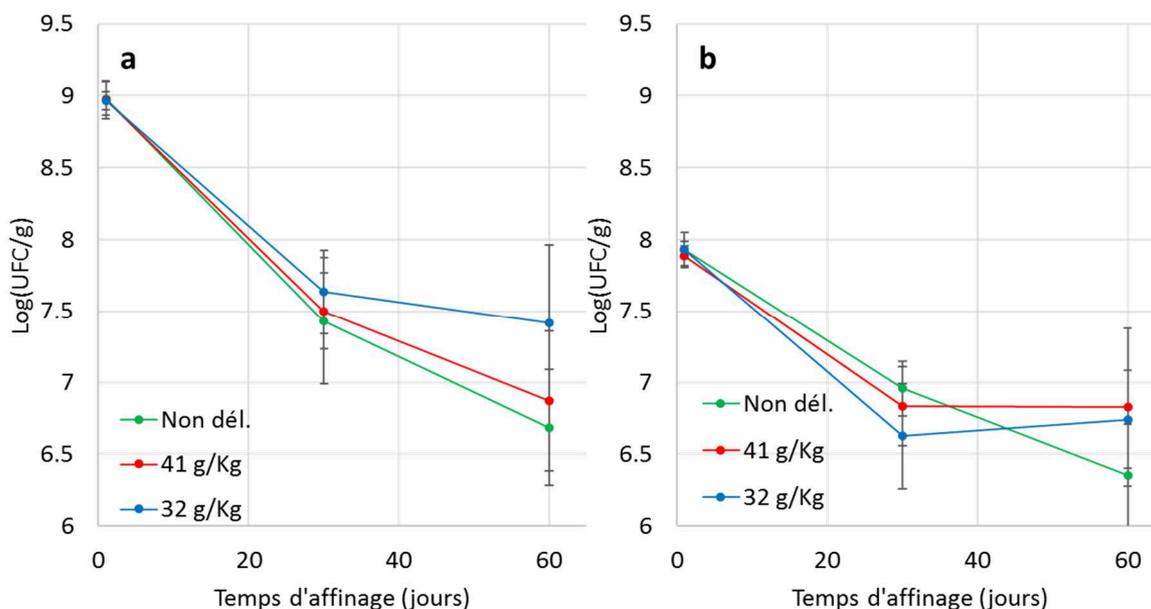


Figure 58 : Évolutions des populations de lactocoques (a) et leuconostocs (b) au cours de l'affinage.

4.5 Protéolyse

Différents niveaux de protéolyse ont été mesurés dans les fromages en fin d'affinage en fonction du niveau de dé lactosage. Les fromages les plus dé lactosés, 32 g/kg, se démarquent par une protéolyse primaire (NS/NT) et une protéolyse secondaire (NPN/NT) plus importantes (Tableau 26). En revanche, la part de protéolyse secondaire par rapport à la protéolyse primaire (NPN/NS) n'est pas significativement différente d'un niveau à l'autre (Tableau 26). Le niveau d'activités protéolytiques des fromages semble lié au niveau de dé lactosage en lien avec le pH. En effet, les fromages 32 g/kg se démarquent des fromages Non dél. et 41 g/kg à la fois avec un niveau de protéolyse plus élevé et avec un pH plus élevé.

L'analyse des fractions caséiques des fromages en fin d'affinage peut apporter des informations supplémentaires concernant la nature des protéases actives car elles hydrolysent les caséines sur des sites qui leur sont spécifiques. Les 4 caséines principales constituant la matrice du fromage n'ont pas été hydrolysées dans les mêmes proportions (Figure 59). En effet, les quantités de caséines α -S1, α -S2 et β mesurées diminuent avec l'augmentation du niveau de dé lactosage. Les caséines κ n'ont pas été affectées significativement par le niveau de dé lactosage mais elles tendent à être plus dégradées lorsque le niveau de dé lactosage augmente.

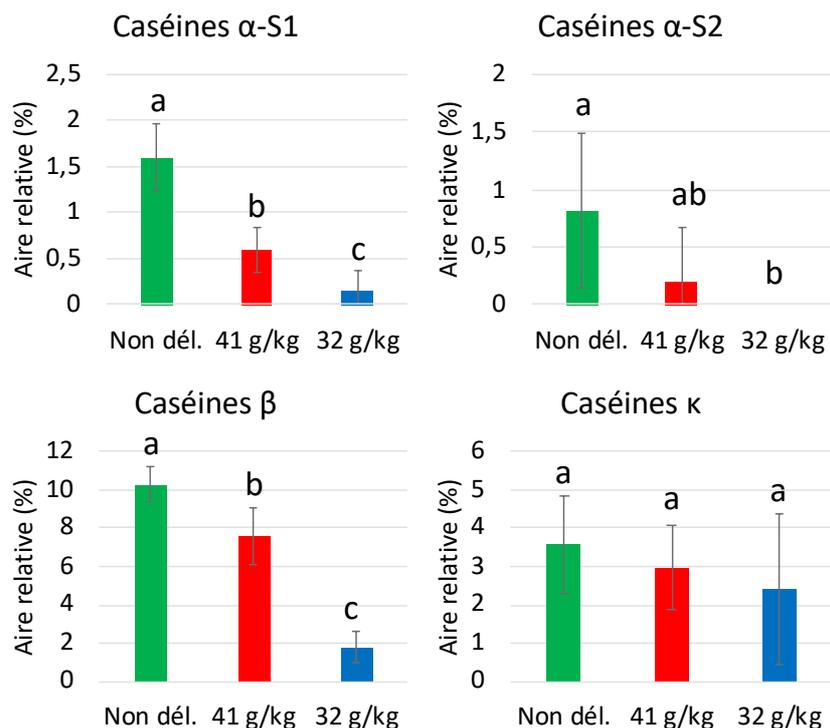


Figure 59 : Aires relatives correspondant aux caséines α -S1, caséines α -S2, caséines β et caséines κ , par rapport à l'aire totale du spectre chromatographique.

La dégradation accrue des caséines α -S2 et β reflète une augmentation de l'activité de la plasmine (Ardö *et al.*, 2017) car ces caséines sont des substrats spécifiques de cette protéase (Figure 59). En effet, la plasmine est active de manière optimale à pH 7,5 et les caséines α -S2 et β ont été les plus dégradées dans les fromages ayant le pH le plus élevé.

Les caséines α -S1 présentent également une dégradation qui augmente avec l'augmentation du niveau de délactosage. Or, la dégradation de cette caséine est en général liée à l'activité de la chymosine qui agit de manière optimale à pH 3-4. Cependant, l'augmentation de l'activité de cette protéase est peu probable car 1) son activité ne peut pas augmenter dans des fromages dont le pH s'éloigne du pH optimal et 2) une diminution de l'activité de la chymosine en lien avec le délactosage a été mesurée au démoulage. Cette caséine a donc été dégradée par d'autres protéases. Les lactocépines présentes sur les parois de *Lactococcus Lactis* peuvent avoir joué un rôle dans cette dégradation. Ces protéases agissent de manière optimale entre pH 5,5 et 6,5 et la lactocépine PIII dégrade spécifiquement les caséines α -S1, β et κ (Ardö *et al.*, 2017). Plusieurs éléments jouent en faveur de cette hypothèse : la zone de pH correspond à celle des fromages 32 g/kg tandis que les fromages Non dél. et 41 g/kg ont un pH inférieur à pH 5,5 et les fromages 32 g/kg présentent également des populations de

lactocoques supérieures aux autres niveaux. En revanche, la caséine κ n'est pas significativement affectée par le niveau de dé lactosage, bien que sa concentration ait tendance à diminuer avec l'augmentation du niveau de dé lactosage (Figure 59).

Le profil peptidique des fromages a également été affecté par le niveau de dé lactosage. Les principales différences sont visibles entre 80 et 100 minutes, c'est-à-dire dans la zone des peptides les plus hydrophobes (Figure 60). Les fromages 32 g/kg ont des pics plus importants dans cette zone, comparés aux fromages Non dél. et 41 g/kg. Les aires de ces zones ont été intégrées pour quantifier les peptides hydrophobes et ont montré une différence significative entre 32 g/kg d'un côté et Non dél. et 41 g/kg de l'autre, sans impact du mode de dé lactosage.

La taille de ces peptides a pu être estimée en analysant les mêmes échantillons filtrés sur une membrane caractérisée par une porosité de 3 kDa, retenant ainsi les peptides libérés par la protéolyse primaire. La Figure 61 présente les profils peptidiques des échantillons filtrés. Nous pouvons observer qu'avec ce traitement, il reste très peu de peptides hydrophobes entre 80 et 100 min. Cela suggère que les peptides les plus hydrophobes sont de grands peptides issus de la protéolyse primaire et que ceux-ci sont susceptibles de créer des différences de propriétés élastiques entre les différents niveaux de dé lactosage.



Figure 60 : Profils peptidiques des fromages 32 g/kg LS=E (a), 41 g/kg LS>E (b), 32 g/kg (c), Non dél. (d), 41 g/kg (e) à partir d'échantillons filtrés sur 0,2 μm.

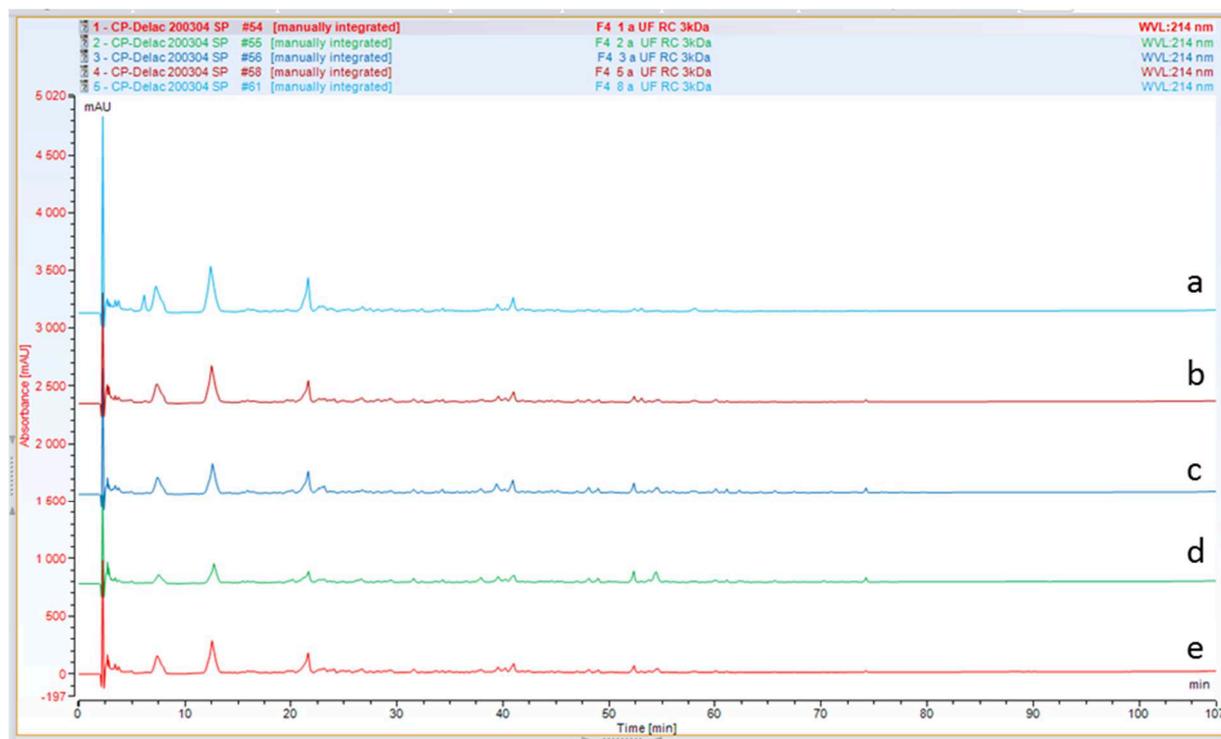


Figure 61 : Profils peptidiques des fromages 32 g/kg LS=E (a), 41 g/kg LS>E (b), 32 g/kg (c), Non dél. (d), 41 g/kg (e) à partir d'échantillons filtrés sur 3 kDa.

4.6 Microstructure

La microstructure du fromage est affectée par les phénomènes physico-chimiques et les activités enzymatiques se déroulant pendant l'affinage. Dans un premier temps, les grains de caillé fusionnent et au fur et à mesure que le Ca INSOL se solubilise, la matrice développe une structure fibreuse formée par des interactions hydrophobes (Lucey *et al.*, 2003). Dans un deuxième temps, les caséines sont dégradées par des enzymes protéolytiques et la matrice se réorganise avec l'apparition de nouveaux sites d'interactions hydrophobes et la solubilisation des peptides hydrophiles.

Des différences de microstructure ont été observées entre les paramètres de dé lactosage (Figure 62). De nombreuses cavités sont visibles dans les fromages Non dél. mais pas dans les autres modalités pour lesquelles le réseau protéique (vert) est homogène et continu. Des différences sont visibles dans la matière grasse (rouge) entre les modes de dé lactosage. Les fromages LS>E présentent des globules gras de tailles plus importantes mais aussi moins sphériques, traduisant une coalescence alors que les fromages LS=E ont des globules gras de tailles plus petites et de formes plus sphériques (Figure 63). La Figure 64 montre que le 3e

quartile de la distribution des globules gras par ordre de surfaces individuelles mesurées sur les images représente ~75 % de l'aire totale occupée par la MG dans les cas des fromages LS>E tandis qu'il représente 65 % à 70 % dans les fromages Non dél. et LS=E. Cela confirme que les fromages LS>E ont globalement plus de « gros » globules gras que les fabrications Non dél. et LS=E.

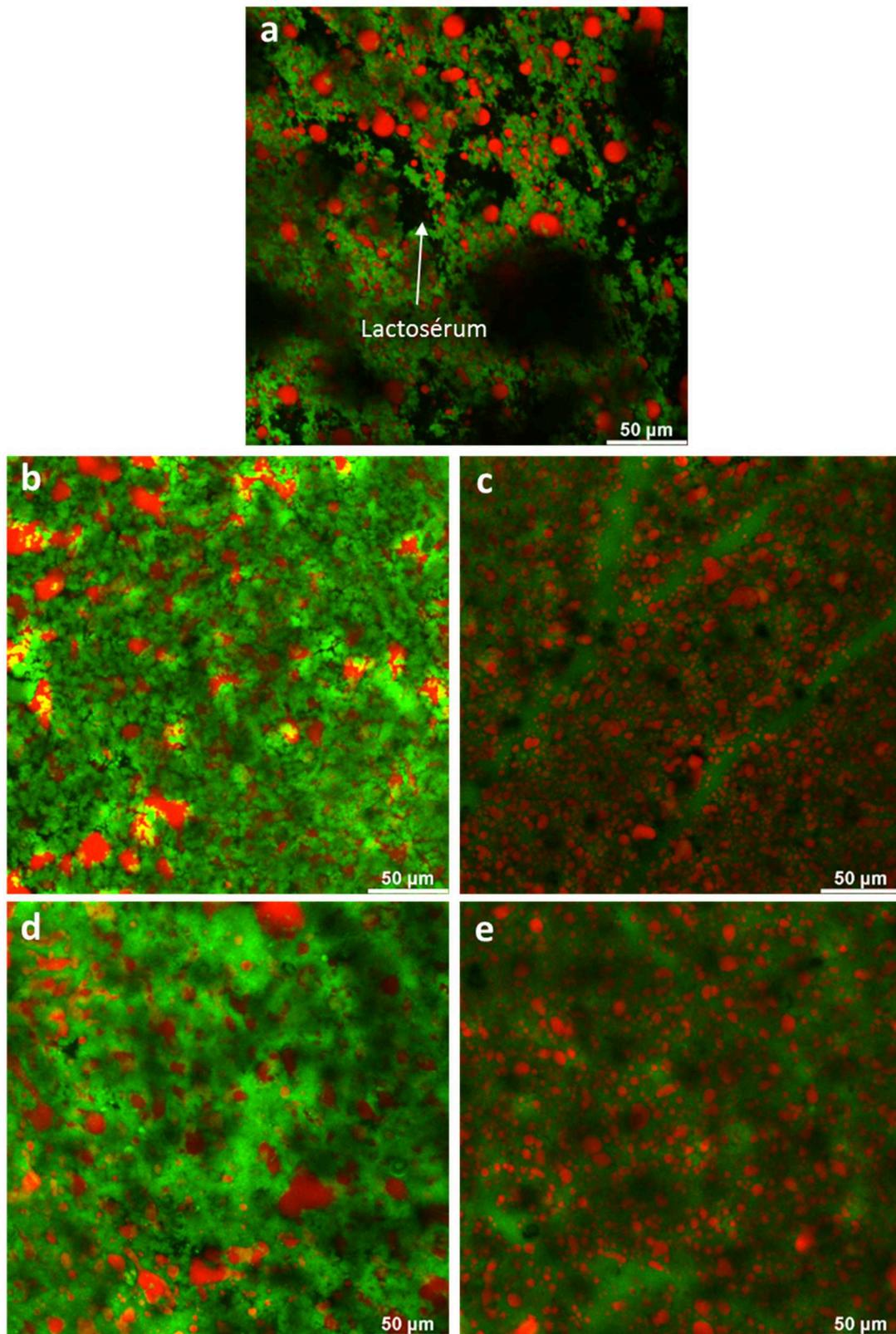


Figure 62 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non délé. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 60 jours d'affinage présentant les protéines codées en vert et la matière grasse codée en rouge.

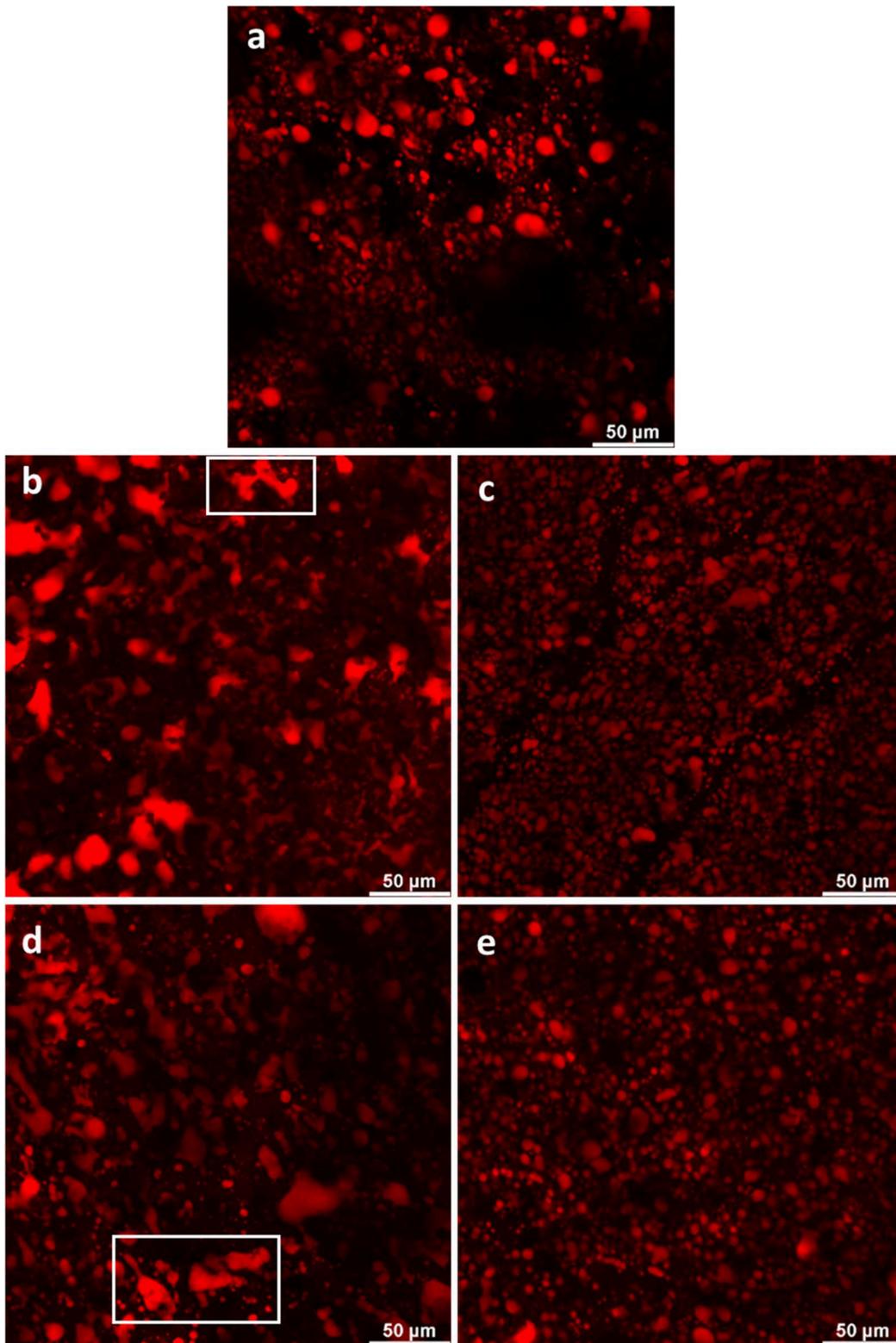


Figure 63 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non déli. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) en fin d'affinage (MG en rouge, éléments encadrés = globules gras coalescents).

Ces cavités contiennent de la phase aqueuse qui a été libérée par le réseau protéique : le faible pH dans ces fromages (autour de 5,0) diminue la charge des caséines, ce qui entraîne une augmentation des interactions hydrophobes et donc leur déshydratation (Guinee, 2007). Le nombre d'interactions hydrophobes étant important, la phase aqueuse libérée se regroupe en cavités.

L'apparition de gros globules gras est due à la rupture de leurs membranes, ayant entraîné leur coalescence (Figure 63). Cet impact avait été observé dans les fromages à

J+5 et est toujours présent en fin d'affinage. Il est probablement dû à l'endommagement de la structure de la matière grasse par la réalisation du mode LS>E pendant la fabrication.

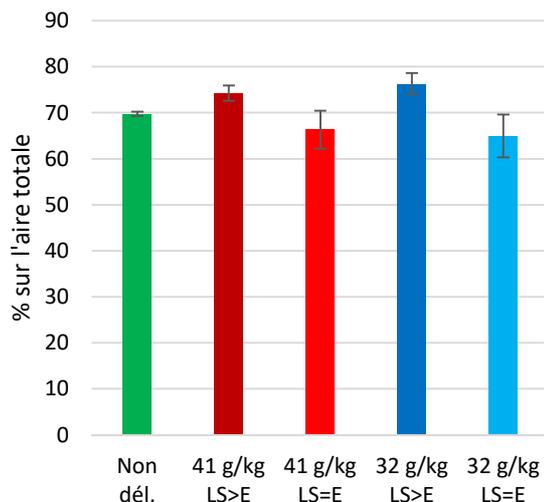


Figure 64 : Surface occupée par les globules gras les plus gros (3e quartile) par rapport à la surface de MG totale mesurée sur les images de microscopie confocale (3 images analysées par modalités présentées en Annexe 15).

5 Impacts sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné

5.1 Propriétés fonctionnelles

Certaines variétés de fromage à pâte pressée non cuite comme la Raclette sont destinées à être consommées autant à chaud, c'est-à-dire fondues ou en conditions gratinantes, qu'à température ambiante (20 °C dans cette étude). Les propriétés fonctionnelles et sensorielles ont donc été étudiées dans ces deux contextes de consommation ou d'utilisation qui entraînent une perception différente des propriétés du fromage. À température ambiante, les propriétés fonctionnelles du fromage ont été mesurées par compression uniaxiale à vitesse constante tandis qu'en conditions gratinantes ou de fonte, ces propriétés ont été mesurées en tant qu'aptitudes culinaires. Les propriétés sensorielles (flaveur et texture) ont été analysées à température ambiante et à chaud, par des panels entraînés.

Il est reconnu que la teneur en Ca INSOL du fromage en fin d'affinage contribue de manière importante aux propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage (Lamichhane *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2010; Lucey *et al.*, 2005). Cependant, cette analyse n'a pas été poursuivie au-delà de 48 h en raison de la difficulté d'extraire la phase aqueuse du fromage au cours de l'affinage. Pour estimer l'impact du Ca INSOL sur les propriétés fonctionnelles du fromage, nous sommes partis du postulat que les différences de teneurs en Ca INSOL du fromage en fin d'affinage sont représentatives des différences observées à 48 h.

5.1.1 Propriétés fonctionnelles à température ambiante : compression uniaxiale à vitesse constante

Les propriétés fonctionnelles à température ambiante ont été évaluées à l'aide de la compression uniaxiale à vitesse constante (CUVC). Celle-ci a permis de mesurer quatre paramètres : le module de déformabilité (MD), la contrainte à la fracture (Cf), le travail à la fracture (Wf) et la déformation à la fracture (Df). Le MD traduit la rigidité de la matrice ; plus la valeur est élevée, plus la matrice est rigide. Le travail à la fracture représente l'énergie nécessaire pour atteindre le point de fracture apparente et la contrainte à la fracture représente la pression nécessaire pour l'atteindre. La contrainte et le travail à la fracture caractérisent la résistance mécanique de la pâte. La déformation à la fracture représente la résistance de la matrice à une grande déformation, elle caractérise donc sa déformabilité. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le Tableau 28. Ces quatre paramètres ont été affectés significativement par le niveau de dé lactosage mais pas par le mode de dé lactosage.

Tableau 28 : Valeurs moyennes de module de déformabilité (MD), déformation à la fracture (Df), contrainte à la fracture (Cf) et d'énergie à la fracture (Wf) et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque paramètre.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
MD (kPa)	***	544,98 ^a	347,78 ^b	65,98 ^c	N.S.	199,90 ^a	213,86 ^a
Df (%)	***	26,17 ^c	37,80 ^b	80,00 ^a	N.S.	59,64 ^a	58,15 ^a
Cf (kPa)	***	87,85 ^b	83,63 ^b	145,38 ^a	N.S.	110,27 ^a	118,75 ^a
Wf (kJ/m³)	***	14,74 ^c	19,17 ^b	32,65 ^a	N.S.	25,84 ^a	25,99 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage (P < 0,05)

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001

La Figure 65 montre l'aspect des échantillons après la mesure des propriétés fonctionnelles par CUVC qui présente une grande différence entre les fromages Non dél. et 32 g/kg. Les fromages Non dél. sont friables, reflétant nettement la fracture de l'échantillon tandis que les fromages 32 g/kg ne présentent pas de signe de fracture visible. Les fromages 41 g/kg ont un aspect intermédiaire.



Figure 65 : Aspect des échantillons de fromage affiné après compression.

La matrice des fromages obtenus avec le niveau de dé lactosage le plus élevé (32 g/kg) est moins rigide (MD le plus faible), a une plus grande résistance mécanique (Cf et Wf plus élevés) et est plus déformable (Df plus élevé). La nature de la matrice des fromages 32 g/kg est tellement souple qu'elle supporte la déformation maximale (80%) sans se fracturer. À l'inverse, les fromages non dé lactosés se caractérisent par une matrice rigide, par une faible résistance mécanique et qui est peu déformable.

Les corrélations entre les paramètres de dé lactosage et les propriétés fonctionnelles à température ambiante sont représentées par ACP dans la Figure 66 (a), qui explique 80,53 % des variations. L'axe F1 (73,27 %) permet de distinguer les fromages par le niveau de dé lactosage et non par le mode de dé lactosage. Cette axe 1 est défini par les propriétés fonctionnelles mesurées. Les propriétés à la fracture sont corrélées positivement avec le pH 48h, le pH J60, le niveau de protéolyse et la teneur en Ca INSOL à 48 h (Figure 66 (b)). Le MD est corrélé positivement avec la concentration en lactose et en lactates à 48 h, le pouvoir tampon et avec les concentrations en caséines α -S1 et β (Figure 66 (b)).

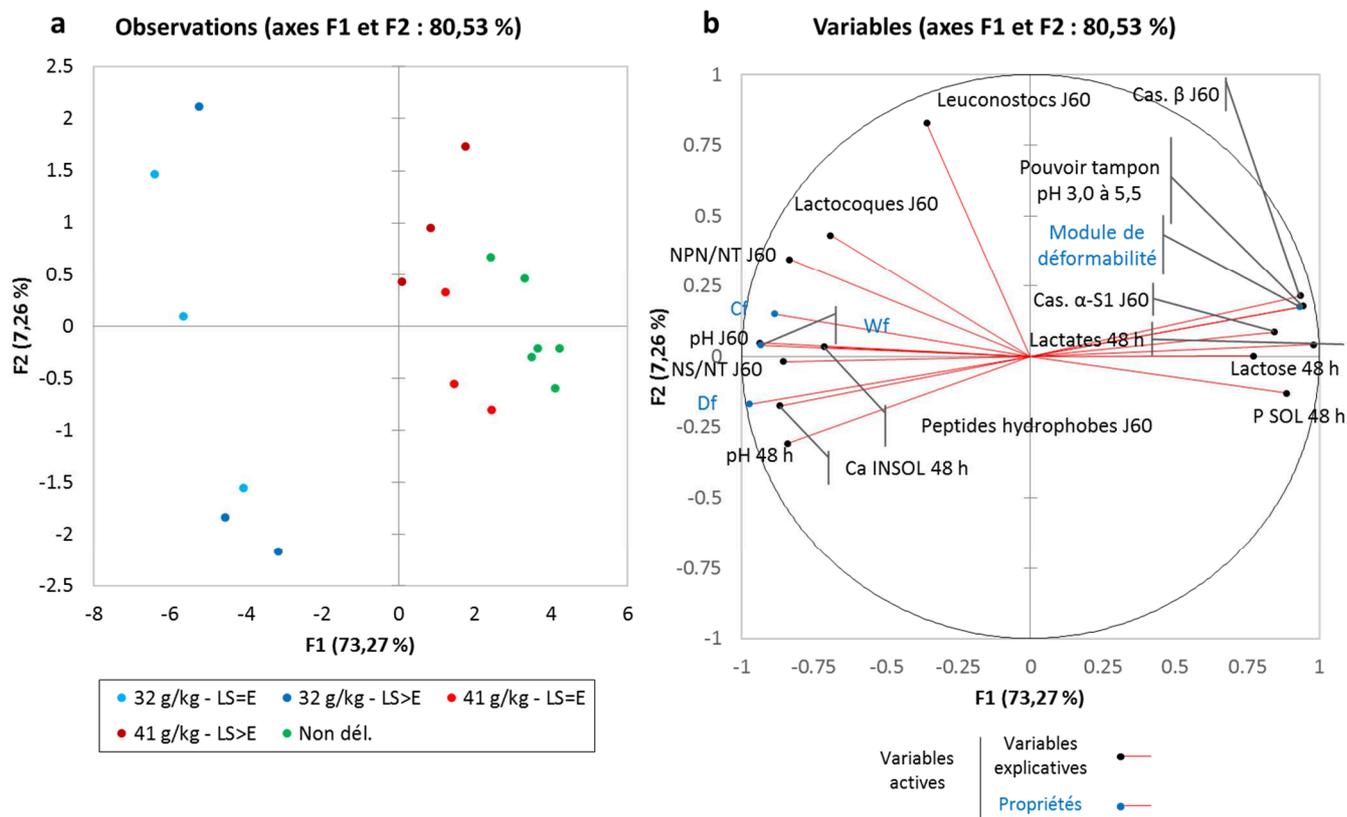


Figure 66 : Représentation par ACP des paramètres de dé lactosage (a) et des propriétés fonctionnelles mesurées à température ambiante ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le dé lactosage (b).

La matrice moins rigide des fromages les plus dé lactosés peut s'expliquer principalement par un pH plus élevé dans le fromage affiné (Visser, 1991). Premièrement, un pH plus élevé dans ces fromages augmente la répulsion électrostatique entre les caséines qui se traduit par un éloignement des caséines entre elles au sein du réseau et donc par une matrice moins rigide (Gagnaire *et al.*, 2002; Lucey *et al.*, 2003). Cette hypothèse est confirmée par une corrélation négative forte ($r=-0,89$) du MD avec le pH (Figure 66). Deuxièmement, un pH élevé favorise une protéolyse plus importante dans ces fromages, et la dégradation des caséines se traduit par une diminution du nombre d'interactions entre elles au sein de la matrice (Visser, 1991). En effet, le MD est fortement corrélé avec les concentrations en caséines α -S1 ($r=0,88$) et caséines β ($r=0,96$) (Figure 66). L'impact du Ca INSOL sur la rigidité de la matrice semble être négligeable car les fromages 32 g/kg, qui ont les concentrations en Ca INSOL les plus importantes sont également les moins rigides (Figure 66).

Les mesures de Cf et de Wf montrent que plus le niveau de dé lactosage est élevé et plus la pression ou la quantité d'énergie nécessaire pour fracturer la matrice est importante (Figure

66). La fracture de l'échantillon est définie comme étant la rupture de toutes les liaisons dans un plan de la matrice de l'échantillon (Walstra & van Vliet, 1982), les propriétés de fracture sont donc liées à la force des interactions entre les caséines qui résistent à cette fracture. Ce résultat est cohérent avec celui de Jaros *et al.* (1997) qui ont rapporté une augmentation de la Cf de la matrice d'Emmental en fin d'affinage liée à l'augmentation du niveau de délactosage. Dans leur étude, l'augmentation du niveau de délactosage a entraîné une diminution de la protéolyse primaire : la résistance plus importante des fromages les plus délactosés a donc pu être expliquée par leur matrice moins dégradée. Cependant, dans notre étude les fromages les plus délactosés, présentant la matrice la plus résistante, sont également les plus protéolysés. Ce résultat suggère que dans notre cas, la protéolyse affecte peu la résistance de la matrice. Le Ca INSOL pourrait être la variable la plus importante expliquant la résistance de la matrice, qui est positivement et fortement corrélée avec la contrainte à la fracture ($r=0,75$) et avec l'énergie à la fracture ($r=0,79$) (Figure 66). Plus la teneur en Ca INSOL dans la matrice est élevée et plus les interactions entre caséines sont fortes et plus l'énergie ou la force nécessaire pour fracturer l'échantillon est élevée (Lucey *et al.*, 2003). La corrélation positive entre la teneur en Ca INSOL et la Cf ne peut pas être confirmée par l'étude de Jaros *et al.* (1997) car ils n'ont pas mesuré cette variable dans leur étude. Cependant, des corrélations positives fortes entre la teneur en Ca INSOL et le module de stockage G' ont précédemment été rapportées, montrant que cette variable contribue aux propriétés élastiques de la matrice en augmentant la force des interactions entre les caséines (Lee *et al.*, 2011; Lucey *et al.*, 2005). Les propriétés de Cf et de Wf sont également corrélées positivement avec la concentration en grands peptides hydrophobes (Figure 66). Bien que cette corrélation soit relativement faible ($r=0,57$), ces peptides sont susceptibles d'augmenter la force des interactions hydrophobes dans la matrice et donc d'augmenter la force ou l'énergie nécessaire pour la fracturer (Lacou *et al.*, 2016). Le pH ne semble pas affecter la résistance de la matrice par son impact direct sur la répulsion électrostatique entre les caséines car ce sont les fromages ayant le plus haut pH qui ont la matrice la plus résistante. Néanmoins, l'évolution du pH est un paramètre important pour la résistance de la matrice car elle conditionne la solubilisation du Ca INSOL et donc sa teneur en fin d'affinage.

L'augmentation du niveau de délactosage a entraîné une augmentation de la Df des fromages affinés (Figure 66). Ce résultat est cohérent avec ceux de Jaros *et al.* (1997) qui ont également

rapporté une augmentation de la Df dans l'Emmental affiné liée à l'augmentation du niveau de dé lactosage. Dans cette étude, l'augmentation de la déformabilité de l'Emmental peut s'expliquer par une protéolyse moindre dans les fromages les plus dé lactosés, entraînant une résistance accrue de la matrice à la déformation. Toutefois, dans notre cas la protéolyse semble avoir contribué à la déformabilité de la matrice du fromage d'une autre manière car les fromages les plus déformables sont également les plus protéolysés. En effet, la Df est corrélée positivement avec NS/NT ($r=0,83$) et négativement avec les caséines α -S1 ($r=-0,82$) et β ($r=-0,97$) (Figure 66). Les fromages 32 g/kg sont à la fois les moins rigides (donc les plus souples) à cause du pH élevé et de la protéolyse élevée de leur matrice, mais également les plus résistants, principalement à cause de leur teneur en Ca INSOL élevée. Il est donc probable que l'association d'une grande souplesse et d'une grande résistance, conférées par des interactions de natures différentes ait entraîné une plus grande déformabilité de la matrice. La corrélation positive de la déformation à la fracture et de la teneur en Ca INSOL à 48 h ($r=0,85$) confirme la contribution du Ca INSOL en tant que facteur de résistance de la matrice (Figure 66). Ce résultat est cohérent avec la forte corrélation rapportée par Lamichhane *et al.* (2019) entre la déformation à la fracture et le Ca INSOL. En outre, d'autres interactions sont formées par les peptides libérés. En effet, il a été démontré que les grands peptides hydrophobes (au moins 20 acides aminés) contribuent à améliorer la résistance de la matrice à l'étirement au même titre que les interactions électrostatiques (Lacou *et al.*, 2015). Dans notre étude, l'augmentation du niveau de dé lactosage a entraîné une augmentation de la concentration de grands peptides hydrophobes dans la matrice (c.f. partie 4.5). Dans ce sens, la corrélation entre la Df et les peptides hydrophobes ($r=0,72$) peut refléter une contribution de ces molécules à la résistance de la matrice à la déformation (Figure 66). La contribution du pH à la Df a été rapportée dans la littérature, décrivant qu'un pH bas entraîne le développement d'une matrice friable et donc peu déformable (Lucey *et al.*, 2003). La contribution du pH à la déformabilité est confirmée dans notre étude par une corrélation positive forte ($r=0,92$) (Figure 66). Cependant, le pH affecte davantage la déformabilité de la matrice en conditionnant la solubilisation du Ca INSOL et la vitesse de protéolyse.

L'augmentation du niveau de dé lactosage a entraîné à la fois une diminution de la rigidité de la matrice et une augmentation de sa résistance, qui résultent par conséquent d'une déformabilité accrue. D'une part, l'augmentation du niveau permet le développement d'une

matrice souple avec un pH élevé qui favorise la répulsion électrostatique entre les caséines ainsi que les activités enzymatiques alcalines qui conduisent à la protéolyse. D'autre part, l'augmentation du niveau de dé lactosage augmente la résistance mécanique de la matrice en limitant la solubilisation du Ca INSOL grâce à un pH élevé et en augmentant la force et le nombre des interactions hydrophobes générées par les grands peptides hydrophobes libérés par la protéolyse. L'attribution de ces impacts reste aujourd'hui au stade de l'hypothèse car ces propriétés résultent d'interactions moléculaires interdépendantes difficiles à identifier spécifiquement. L'impact de la teneur en Ca INSOL, en particulier, doit être considéré avec précaution car il a été déterminé à partir des teneurs à 48 h. Les corrélations avec le Ca INSOL sont donc des pistes d'explications qui nécessitent d'être confirmées avec des teneurs mesurées en fin d'affinage.

5.1.2 Propriétés fonctionnelles à chaud : aptitudes culinaires

Les aptitudes culinaires du fromage, correspondant aux propriétés fonctionnelles à chaud, ont été étudiées à travers 5 critères : le filant, l'étalement, l'exsudation d'huile, l'élasticité mesurée par une force d'extrusion et le gratinant caractérisé par trois paramètres colorimétriques L*, a* et b* (Tableau 29). Le mode de dé lactosage a eu un impact significatif sur une seule propriété, l'exsudation d'huile du fromage tandis que le niveau de dé lactosage ne l'a pas affecté. En effet, les fromages LS>E ont exsudé significativement plus d'huile lors du chauffage que les fromages LS=E (Tableau 29). Les aptitudes filant, l'élasticité (force d'extrusion) et l'étalement ont été affectés significativement par le niveau de dé lactosage. Les fromages 32 g/kg forment des fils significativement plus longs que les fromages Non dél. et nécessitent significativement plus de force pour être extrudés que les fromages Non dél. et 41 g/kg (Tableau 29). En revanche, les fromages 32 g/kg et 41 g/kg s'étalent significativement moins que les fromages Non dél. sous l'effet de la chaleur (Tableau 29). L'aptitude du fromage à gratiner a été mesurée au travers de paramètres colorimétriques L* qui exprime la clarté de la couleur du gratin (de 0 à 100), a* qui exprime la couleur sur un axe allant du vert (-60) au rouge (+60) et b* qui exprime la couleur sur un axe allant du bleu (-60) au jaune (+60). Plus le niveau de dé lactosage augmente et plus le paramètre L* est élevé, reflétant une couleur plus claire et plus le paramètre a* diminue, reflétant une coloration moins rouge. En revanche, le paramètre colorimétrique b* n'a pas été affecté par le niveau de dé lactosage.

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Tableau 29 : Valeurs moyennes des aptitudes culinaires pour chaque niveau et chaque mode de dé lactosage, et significativité de l'impact du paramètre de dé lactosage sur chacune des aptitudes mesurées.

	Niveau			Mode			
	Sign.	Non dél.	41 g/kg	32 g/kg	Sign.	LS>E	LS=E
Filant (mm)	*	152,33 ^a	304,50 ^{ab}	449,33 ^b	N.S.	449,50 ^a	304,33 ^a
Étalement (-)	**	3,39 ^a	3,03 ^b	3,07 ^b	N.S.	3,01 ^a	3,10 ^a
Exsudation d'huile (g/100 g)	N.S.	8,42 ^a	10,00 ^a	10,25 ^a	**	11,38 ^a	8,88 ^b
Force d'extrusion (kgF)	***	0,68 ^b	0,85 ^b	1,25 ^a	N.S.	1,12 ^a	0,98 ^a
L* (u.a.)	**	64,92 ^a	67,29 ^b	69,05 ^c	N.S.	67,75 ^a	68,60 ^a
a* (u.a.)	***	9,22 ^c	7,27 ^b	5,06 ^a	N.S.	6,30 ^a	6,03 ^a
b*(u.a.)	N.S.	48,44 ^a	48,54 ^a	48,37 ^a	N.S.	49,11 ^a	47,80 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage ($P < 0,05$).

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$

Les corrélations entre les paramètres de dé lactosage et les propriétés fonctionnelles sont représentées par ACP dans la Figure 67 (a), qui explique 73,17 % des variations. L'axe F1 (62,84 %) permet de distinguer les fromages selon les niveaux de dé lactosage. En revanche, les modes sont distribués aléatoirement dans la figure, reflétant les faibles liens entre les variables mesurées et ce paramètre de dé lactosage. Dans la Figure 67 (b), les fromages 32 g/kg sont caractérisés par des paramètres de force d'extrusion, d'aptitude à filer, et du paramètre colorimétrique L* plus élevés. Ces critères sont corrélés positivement avec un niveau de protéolyse, un pH à J60, et une teneur en Ca INSOL à 48 h plus importants. À l'opposé, le paramètre colorimétrique a* plus élevé caractérise les fromages Non dél. et 41 g/kg et une aptitude d'étalement plus importante caractérise plutôt les fromages Non dél. L'aptitude d'étalement s'éloigne de l'axe F1 et donc des variables explicatives caractérisant les niveaux de dé lactosage. L'aptitude à exsuder de l'huile s'éloigne aussi de l'axe F1 car seul le mode de dé lactosage a affecté cette aptitude, qui est plus important dans les fromages LS>E. Il peut être noté que l'exsudation d'huile se situe à cet endroit car son point est à proximité d'une observation LS>E 32 g/kg et de trois observations 41 g/kg LS>E.

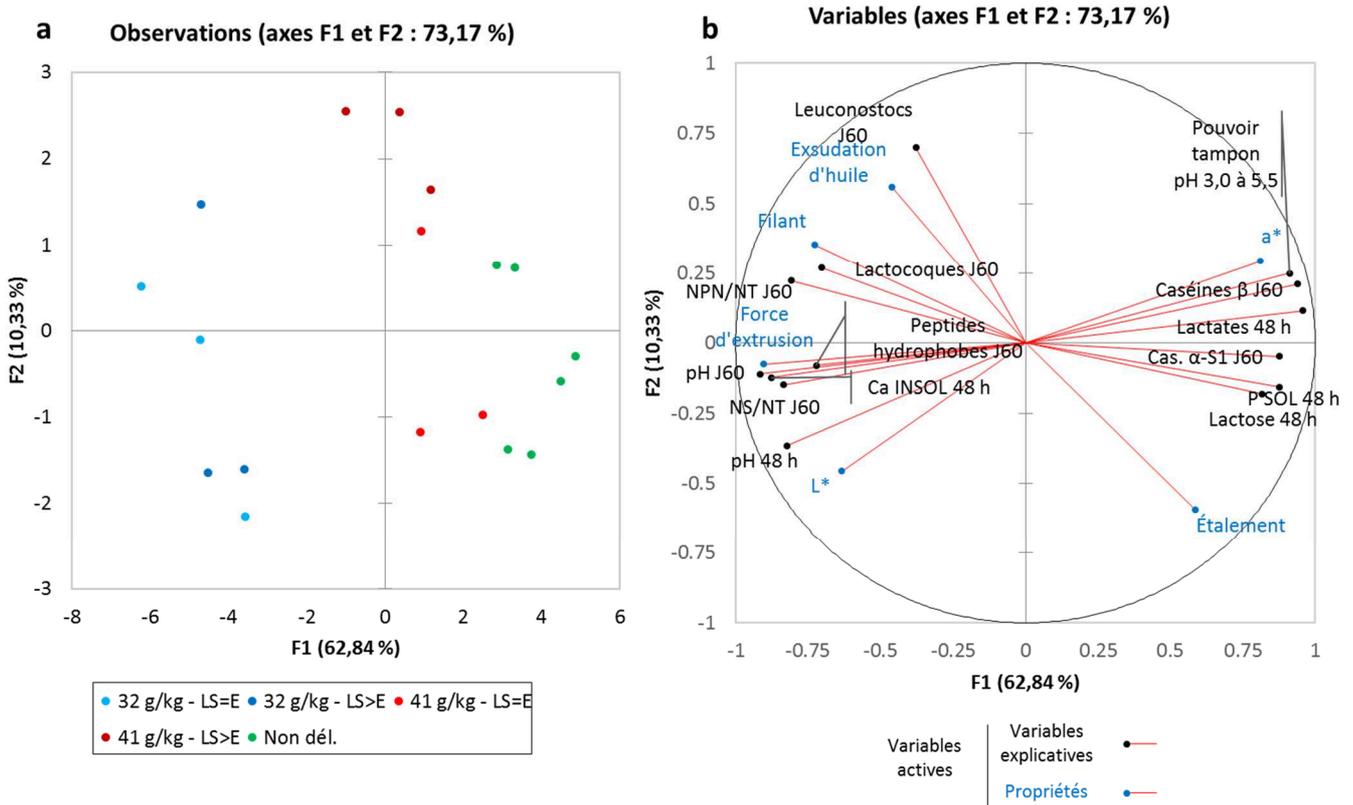


Figure 67 : Représentation par ACP des paramètres de délactosage (a) et des propriétés fonctionnelles mesurées à chaud ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le délactosage (b).

La quantité d'huile exsudée à chaud n'a pas été affectée significativement par le niveau de délactosage, mais a été affectée par le mode qui a eu pour seul impact la modification de la microstructure de la MG. Ces deux impacts qui concernent la MG sont donc probablement liés et auraient peu de liens avec les variables présentées dans la Figure 67. Les analyses de microstructure ont mis en évidence des globules gras coalescents et diffus, traduisant une rupture de leur membrane lipoprotéique. Ainsi, lorsque le fromage est chauffé, la matière grasse se fluidifie mais n'est plus retenue par les membranes lipoprotéiques et exsude davantage d'huile. Dans le cadre de notre étude, le mode LS>E a donc favorisé l'aptitude du fromage à exsuder de l'huile, ou à déphaser, c'est-à-dire à devenir hétérogène sous l'effet de la chaleur.

La force d'extrusion reflète l'élasticité de la matrice à chaud, qui se traduit par une résistance à l'étirement qu'elle subit pendant l'extrusion. Cette propriété traduit la capacité de la matrice à maintenir son intégrité lorsqu'elle est soumise à un étirement, qui dépend du nombre et de la nature des interactions entre les caséines de la matrice. Le Ca INSOL est le principal composant favorisant la résistance de la matrice à l'étirement en créant des interactions entre

les résidus phosphoséryles des caséines (Lucey *et al.*, 2003). Il a en effet été démontré que le Ca INSOL contribue de manière importante au module de conservation G' avec lequel il est fortement corrélé (Lee *et al.*, 2011; Lucey *et al.*, 2005). La forte corrélation de la force d'extrusion et de la teneur en Ca INSOL à 48 h ($r=0,83$) confirme la contribution de cette variable dans la résistance de la matrice à l'étirement (Figure 67). Le niveau 32 g/kg a favorisé la libération de grands peptides hydrophobes qui participent au développement de la résistance à l'étirement (Lacou *et al.*, 2015; Richoux *et al.*, 2009). La résistance à l'étirement implique autant les interactions électrostatiques que les interactions hydrophobes entre les caséines, et ces peptides augmentent le nombre de sites hydrophobes exposés dans la matrice et donc le nombre d'interactions hydrophobes (Lacou *et al.*, 2015). En effet, la force d'extrusion est positivement corrélée avec la concentration en peptides hydrophobes ($r=0,77$), ce qui confirme leur rôle potentiel. Cependant, la libération de peptides hydrophobes est la conséquence de la protéolyse qui ne semble pas affecter la résistance de la matrice car ce sont les fromages 32 g/kg qui sont les plus protéolysés mais également les plus résistants à l'étirement (Figure 67). L'impact direct du pH est l'augmentation de la répulsion électrostatique entre les caséines et donc l'affaiblissement de la matrice, mais cet impact ne semble pas avoir affecté la résistance de la matrice car les fromages les plus résistants (32 g/kg) présentent les pH les plus élevés. En revanche, le pH a joué un rôle important dans la vitesse de solubilisation du Ca INSOL et donc dans la minéralisation de la matrice qui est le principal responsable de la résistance à l'étirement. La propriété du fromage à former des fils est liée à ses propriétés élastiques, c'est-à-dire à sa résistance à l'étirement. Cette propriété est donc fortement corrélée avec la force d'extrusion ($r=0,80$) et peut être expliquée par les mêmes variables. En effet, le filant est corrélé positivement avec la teneur en Ca INSOL ($r=0,72$) et les peptides hydrophobes ($r=0,80$) (Figure 67).

Les fromages Non dél. présentent une aptitude à s'étaler plus importante que les fromages dé lactosés (Figure 67). L'aptitude de la matrice des fromages Non dél. à s'étaler sur une surface plus importante reflète une diminution du module élastique qui dépend du pH du fromage et de la teneur en Ca INSOL (Lee *et al.*, 2011; Lucey *et al.*, 2005). Un pH élevé induit une répulsion électrostatique élevée entre les caséines et donc une matrice souple qui s'étale plus facilement à la chaleur (Lucey *et al.*, 2003). Dans notre cas, les fromages Non dél. sont ceux qui présentent le pH le plus bas, il ne peut donc pas expliquer l'augmentation de la

capacité du fromage à s'étaler. En revanche, ces fromages ont une teneur en Ca INSOL basse à 48 h, qui peut expliquer leur aptitude à s'étaler : moins de Ca INSOL entraîne moins d'interactions entre les caséines et donc une aptitude plus élevée à s'étaler sous l'effet de la chaleur et de la gravité. Cependant dans notre étude, l'étalement n'est pas corrélé avec la teneur en Ca INSOL, donc le lien entre cette variable et cette propriété n'est pas identifié (Figure 67). En revanche, la contribution de la teneur en Ca INSOL ne doit pas être écartée car la teneur en Ca INSOL utilisée ici est celle mesurée à 48 h, il est donc difficile de confirmer la présence ou l'absence de lien avec les données dont nous disposons.

Les mesures colorimétriques ont montré un brunissement différent des échantillons de fromage en conditions gratinantes en fonction du niveau. Ce type de brunissement est dû à la réaction de Maillard entre les acides aminés et le groupe carbonyle des sucres réducteurs (Spanneberg *et al.*, 2012). D'autres molécules, les α -dicarbonyls, comme le glyoxal, le méthylglyoxal et le diacétyl qui sont produites par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, peuvent également réagir avec les acides aminés et induire une réaction de Maillard, étudiée notamment dans le Parmesan (Gandhi *et al.*, 2018). Le brunissement des échantillons de fromage en conditions gratinantes est lié à la diminution du niveau de délactosage et donc probablement à des sucres résiduels, non mesurés au-delà de 48 h. Dans les fromages Non dél., la post-acidification a maintenu un pH proche de 5,0 tout au long de l'affinage qui a pu réduire l'activité des bactéries lactiques et les empêcher de consommer le galactose résiduel, sucre qu'elles dégradent plus difficilement que le glucose. Nous pouvons écarter la possibilité de l'implication des molécules α -dicarbonyls car nous n'avons pas observé d'impact significatif du délactosage sur ces bactéries. Bien que les différences de valeurs colorimétriques soient significatives, ces variations sont assez faibles car elles ne varient que de 4-5 unités sur des échelles comprises entre -60 et +60, ce qui représente une variation de $\sim 4\%$. Cet impact du niveau sur le gratinant est donc un impact mineur qui peut être difficile à distinguer à l'œil nu.

L'augmentation du niveau de délactosage entraîne le développement d'une matrice plus résistante à l'étirement lors de la fonte, c'est-à-dire plus propice à former des fils mais qui est moins apte à s'étaler. Ces propriétés se sont développées sous l'effet d'un pH élevé, d'une protéolyse plus poussée, d'une concentration en grands peptides hydrophobes importante et

probablement grâce à une teneur en Ca INSOL plus importante en fin d'affinage. La teneur en Ca INSOL est un paramètre crucial pour la détermination des mécanismes de développement des propriétés élastiques de la matrice. L'étude de ces mécanismes pourra à l'avenir être approfondie par la détermination de l'impact du niveau de délactosage sur l'évolution de la teneur en Ca INSOL au cours de l'affinage. Le mode LS>E a engendré une quantité d'huile exsudée pendant la fonte du fromage significativement plus importante que le mode LS=E. Ce résultat est probablement lié à l'impact du mode LS>E sur la microstructure des globules gras dont la membrane a été endommagée lors du processus de délactosage et qui retient donc moins la MG fluidifiée lors de la fonte. Le brunissement du fromage en conditions gratinantes est également affecté légèrement mais significativement par le niveau de délactosage en fonction de la quantité de sucres réducteurs et donc probablement de galactose résiduel dans le fromage affiné.

5.2 Propriétés sensorielles

5.2.1 Analyse sensorielle à température ambiante

Les descripteurs sensoriels à température ambiante ont été affectés significativement par le niveau de délactosage mais pas par le mode (Tableau 30). Quatre descripteurs de texture ont été étudiés : la texture cassante, la fermeté, la sécheresse en bouche et le collant. Plus le niveau de délactosage est élevé et moins la texture est cassante, ferme, sèche en bouche et collante. Sept descripteurs de goût ont été étudiés : l'intensité globale, « salé », « acide/lactique », « beurré/lacté », « animal/étable », « amer » et « piquant » (Tableau 30). Globalement, plus le niveau de délactosage est élevé, plus la note de chacun de ces descripteurs est faible, sauf pour le descripteur « animal/étable » pour lequel le niveau 32 g/kg a une note intermédiaire entre le niveau Non dél. et 41 g/kg. Parmi ces descripteurs, seul le descripteur « beurré/lacté » n'a pas été affecté significativement par le délactosage. Globalement, l'intensité globale du goût diminue en lien avec le délactosage.

Tableau 30 : Notes moyennes et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque descripteur sensoriel étudié à température ambiante.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
Texture cassante	***	6,43 ^a	5,32 ^b	1,28 ^c	N.S.	3,46 ^a	3,14 ^a
Fermeté	***	5,11 ^a	4,36 ^b	2,28 ^c	N.S.	3,49 ^a	3,14 ^a
Sécheresse en bouche	***	4,70 ^a	4,23 ^a	2,74 ^b	N.S.	3,68 ^a	3,29 ^a
Collant	***	4,60 ^a	4,99 ^a	3,84 ^b	N.S.	4,32 ^a	4,51 ^a
Intensité globale du goût	***	5,89 ^a	5,18 ^b	5,16 ^b	N.S.	5,24 ^a	5,10 ^a
Salé	***	3,34 ^a	3,17 ^a	2,67 ^b	N.S.	3,07 ^a	2,77 ^a
Acide/lactique	***	4,56 ^a	3,60 ^b	2,73 ^c	N.S.	3,34 ^a	2,99 ^a
Beurré/lacté	N.S.	3,61 ^a	3,68 ^a	3,88 ^a	N.S.	3,85 ^a	3,71 ^a
Animal/étable	**	1,53 ^a	0,94 ^b	1,14 ^{ab}	N.S.	0,98 ^a	1,11 ^a
Amer	**	2,31 ^a	2,15 ^a	1,67 ^b	N.S.	1,93 ^a	1,89 ^a
Piquant	*	1,62 ^a	1,36 ^{ab}	1,08 ^b	N.S.	1,27 ^a	1,18 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de dé lactosage ($P < 0,05$)

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$

La Figure 68 montre l'analyse par ACP des liens entre les descripteurs sensoriels à température ambiante et les niveaux de dé lactosage. 42,88 % de l'information sont représentés par les deux axes, dont 29,40 % est représenté par l'axe F1. Il permet de distinguer les fromages selon le niveau de dé lactosage : les fromages 32 g/kg et Non dél. sont situés sur la gauche et sur la droite de la figure, respectivement, tandis que les fabrications 41 g/kg se situent au milieu. Ce résultat montre qu'à température ambiante, les descripteurs sensoriels discriminent essentiellement les fromages Non dél. et 32 g/kg.

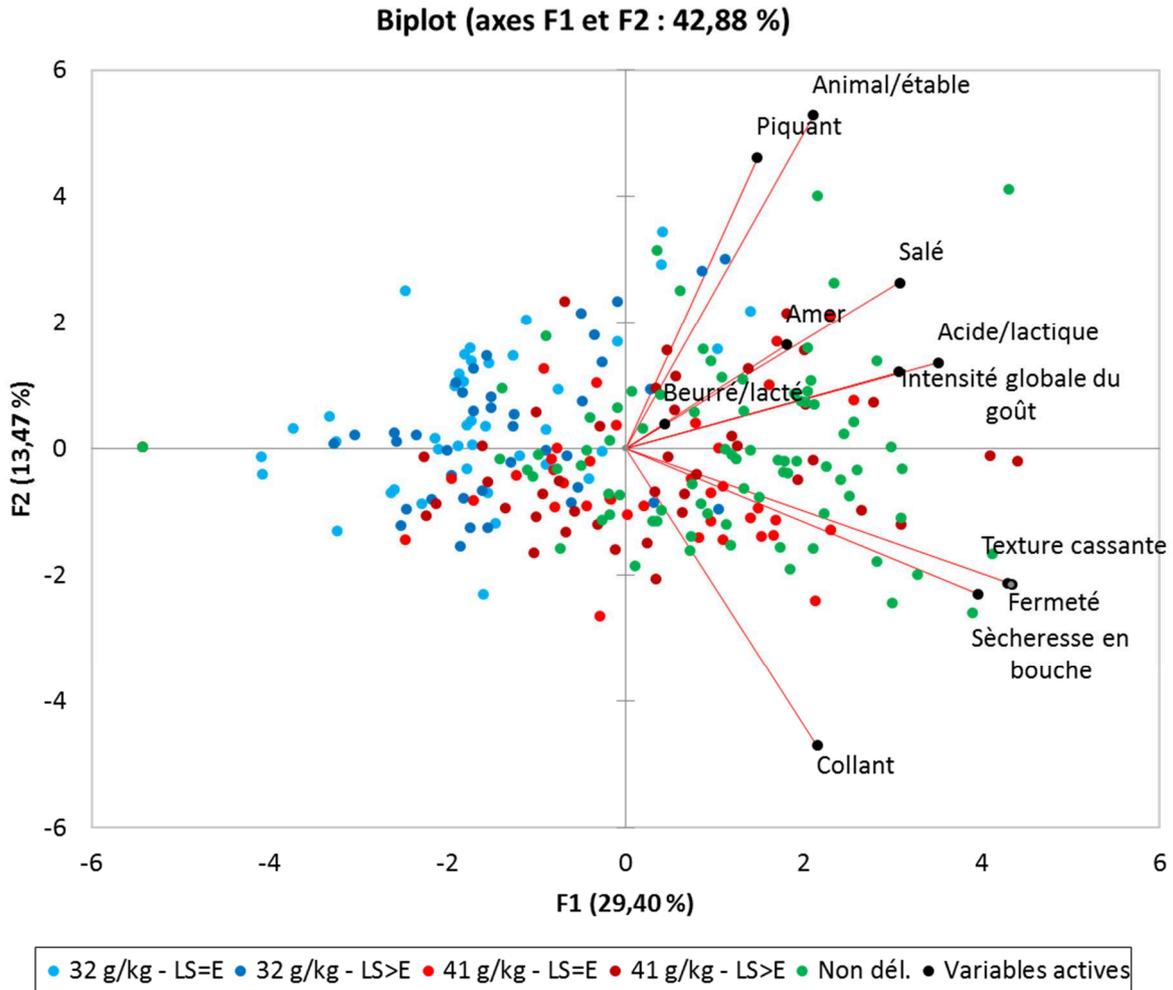


Figure 68 : Représentation par ACP des descripteurs sensoriels étudiés à température ambiante par rapport aux niveaux de délactosage.

La diminution globale des descripteurs de flaveur en lien avec l'augmentation du niveau de délactosage est cohérente avec la littérature. En effet, Shakeel-Ur-Rehman *et al.* (2004) et Hou *et al.* (2014) ont rapporté la diminution globale du caractère de fromages délactosés par rapport aux non délactosés en variété Cheddar. Comme dans notre étude, les fromages délactosés ont été jugés moins acides et avec une intensité globale du goût moins élevée. En accord avec nos observations sur les propriétés de texture, Shakeel-Ur-Rehman *et al.* (2004) ont également rapporté une diminution de la fermeté avec le délactosage.

Dans la Figure 69, les descripteurs sensoriels à température ambiante sont mis en lien avec les variables explicatives mesurées pendant la fabrication et l'affinage dans une ACP représentant 55,95 % de l'information. L'axe F1 (47,46 %) permet de séparer les fromages selon le niveau de délactosage (Figure 69). Les modes LS>E et LS=E ont tendance à se

différencier car la diminution de la récupération de la MG engendrée par le mode LS>E tend à affecter les autres composants de la MS (Figure 69 (a)). En revanche, les descripteurs sensoriels sont globalement peu représentés par l'axe F1 car ils se regroupent entre l'axe F1 et l'axe F2, suggérant qu'ils sont peu liés aux variables explicatives mesurées dans notre étude. Les descripteurs de texture sont les plus proches des variables explicatives et de l'axe F1 tandis que les descripteurs sensoriels de saveur et d'arôme semblent être décrits principalement par l'axe F2 qui apporte peu d'information (8,48 %) (Figure 69 (b)). La fermeté et la texture cassante sont corrélées positivement avec les caséines α -S1 et β et négativement avec le pH et le Ca INSOL à 48 h. Ainsi, les fromages Non dél. et 41 g/kg, qui sont les moins protéolysés mais ayant également une teneur en Ca INSOL moins élevée et un pH faible ont une texture plus cassante et plus ferme à température ambiante. Ce résultat est cohérent avec les propriétés fonctionnelles mesurées par CUVC, qui ont permis de déterminer que plus le niveau de dé lactosage est faible et plus la matrice du fromage est peu résistante et rigide.

Les faibles corrélations entre les descripteurs de flaveur et les variables explicatives suggèrent que les variables à notre disposition ne sont pas suffisantes pour expliquer les différences de flaveurs engendrées par le niveau de dé lactosage. L'arôme « acide/lactique » est fortement lié à la concentration en acide lactique dans le fromage au moment de la dégustation (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). Cependant, sur la Figure 69 ce descripteur est faiblement corrélé avec l'acide lactique car il a été mesuré à 48 h, il n'est donc pas représentatif des concentrations en fin d'affinage. Bien que la saveur salée soit plus faible dans les fromages 32 g/kg que dans les fromages Non dél. et 41 g/kg, ce descripteur n'est pas ou peu corrélé avec les variables explicatives. En effet, la saveur salée dans le fromage peut être due à plusieurs variables : le NaCl, les peptides γ -G et certains acides aminés comme l'arginine (Fox *et al.*, 2017). Parmi ces variables, seul le NaCl a été analysé en fin d'affinage et sa teneur est similaire dans tous les fromages. Cette différence est donc probablement due à la composition en peptides et en acides aminés susceptible d'être modifiée par le dé lactosage. En effet, Hou *et al.* (2014) ont rapporté des différences de profils d'acides aminés entre les fromages Cheddar dé lactosés avec différents niveaux, qui ont également affecté leur profil sensoriel. Les auteurs suggèrent que le dé lactosage a pu modifier la composition de la microflore d'affinage, sans en avoir modifié le niveau total de population, et ainsi affecter le métabolisme des acides aminés pendant l'affinage. Dans notre étude, le niveau de dé lactosage a affecté les populations de

193

lactocoques et leuconostocs pendant l'affinage, qui semblent avoir eu un impact sur la protéolyse primaire et secondaire. Il est donc envisageable que le niveau de délactosage ait pu affecter les activités métaboliques de la microflore du fromage et par ce biais affecter le profil sensoriel des fromages. D'autres descripteurs sont liés à la composition en acides aminés et sont susceptibles d'avoir été modifiés par un impact du délactosage sur le métabolisme des acides aminés. Le goût « animal/étable » est également lié aux peptides γ -G et la saveur amer est liée aux petits peptides hydrophobes tels que l'isoleucine, la phenylalanine, la leucine, la methionine, la proline et la valine (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). Bien que les fromages 32 g/kg soient caractérisés par des concentrations en peptides hydrophobes plus importantes, ils sont significativement moins amers que les fromages Non dél. et 41 g/kg. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'une grande majorité des peptides hydrophobes observés dans ces fromages ont une taille supérieure à 3 kDa et sont moins vecteurs d'amertume que les petits peptides et les acides aminés (Kilcawley & O'Sullivan, 2018). L'impact du délactosage sur les citrates a pu diminuer la quantité de molécules aromatiques issues de leur métabolisme, c'est-à-dire l'acide acétique, le diacétyle et l'acétoïne, qui sont liées aux descripteurs « piquant » et « beurré/lacté ». Le descripteur « beurré/lacté » n'a pas été affecté significativement par le délactosage. En revanche, les fromages 32 g/kg ont été jugés moins « piquants » que les deux autres niveaux, qui est une conséquence potentielle de la diminution de la concentration en citrates par le délactosage à partir desquels moins d'acide acétique a pu être produit.

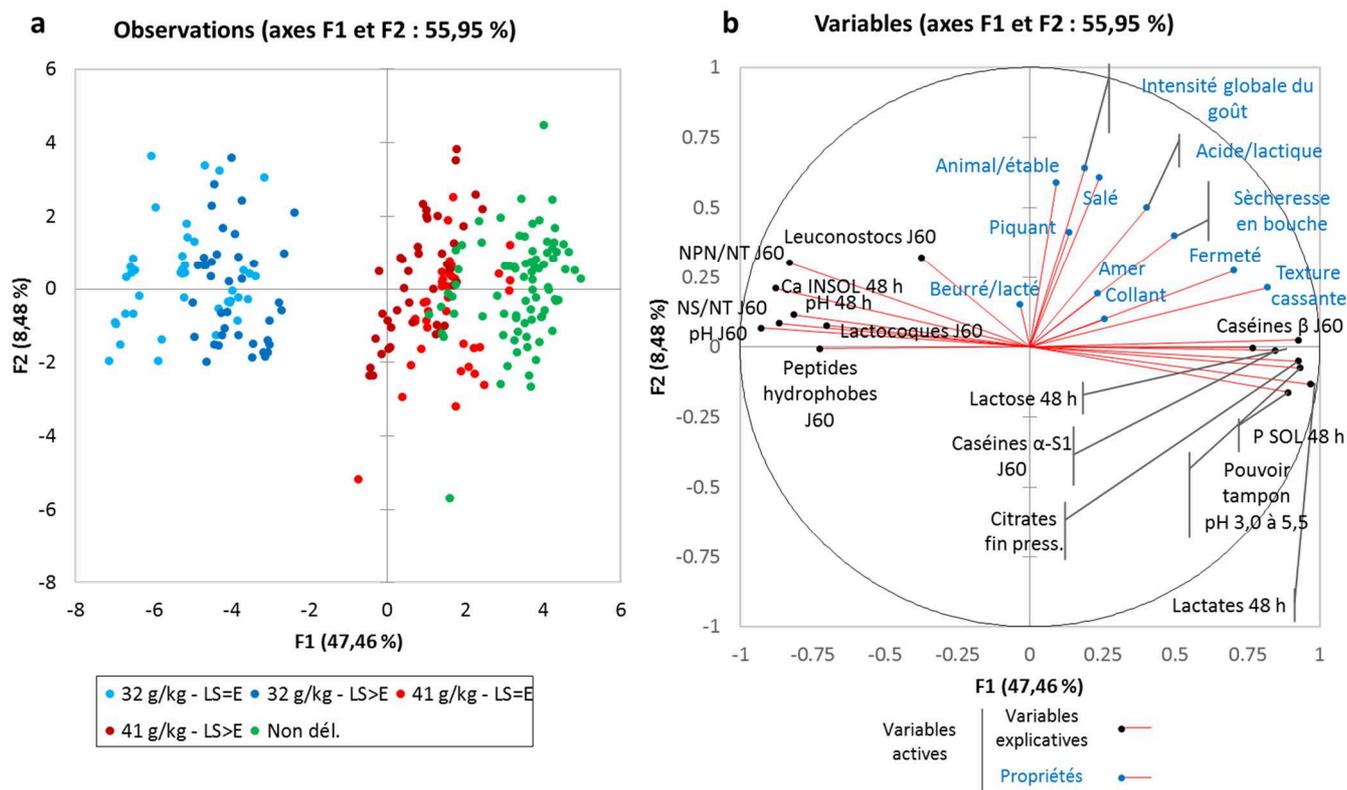


Figure 69 : Représentation par ACP des paramètres de dé lactosage (a) et des descripteurs sensoriels à température ambiante ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le dé lactosage (b).

Une augmentation du niveau de dé lactosage affecte le profil sensoriel des fromages consommés à température ambiante en diminuant globalement l'intensité de leur goût et en rendant leur texture moins ferme et moins cassante. Certains impacts du niveau de dé lactosage sur les propriétés sensorielles à température ambiante ont pu être expliqués avec les variables explicatives que nous avons à notre disposition. La texture cassante et la fermeté sont liées au pH du fromage, à l'état protéolytique de la matrice et à sa teneur en Ca INSOL, et sont cohérentes avec les propriétés fonctionnelles mesurées à température ambiante. Cependant, une majorité des descripteurs sensoriels n'a pas pu être expliquée car les variables impliquées n'ont pas été mesurées. Des mesures de concentration en acide lactique et en acide acétique en fin d'affinage auraient pu permettre d'établir un lien direct entre le niveau de dé lactosage et les descripteurs « acide/lactique » et « piquant ». Les autres descripteurs sensoriels auraient nécessité une étude approfondie des petits peptides et des profils d'acides aminés dans le fromage pour pouvoir expliquer les différences engendrées par le niveau de dé lactosage.

5.2.2 Analyses sensorielles à chaud

Le délactosage a affecté significativement la perception sensorielle du fromage à chaud (Tableau 31). Le niveau de délactosage est le paramètre qui affecte le plus les descripteurs sensoriels car un seul descripteur a été affecté par le mode de délactosage, qui est l'aspect déphasé du fromage. Le mode LS>E induit un déphasage plus important du fromage lorsqu'il est chauffé que le mode LS=E. Cinq descripteurs sensoriels ont été significativement affectés par le niveau de délactosage : la texture caoutchouteuse, « fondant-fuyant » en bouche, l'arôme « acide/lactique », la saveur amère et la persistance du goût. Plus le niveau de délactosage est élevé et plus la texture du fromage est caoutchouteuse et à l'inverse est moins fondante en bouche. L'arôme « acide/lactique » diminue avec le niveau de délactosage ainsi que l'amertume. L'impact du niveau de délactosage sur la persistance du goût en bouche est faiblement significatif et induisant une persistance plus importante pour les fromages Non dél., suivi des fromages 32 g/kg puis 41 g/kg.

Tableau 31 : Notes moyennes et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque descripteur sensoriel étudié à chaud.

	Sign.	Niveau			Sign.	Mode	
		Non dél.	41 g/kg	32 g/kg		LS>E	LS=E
Intensité globale de l'odeur	N.S.	5,25 ^a	5,01 ^a	5,54 ^a	N.S.	5,23 ^a	5,32 ^a
Aspect déphasé	N.S.	2,15 ^a	2,38 ^a	2,16 ^a	**	2,49 ^a	2,05 ^b
Aspect fluide	N.S.	5,85 ^a	5,78 ^a	5,22 ^a	N.S.	5,41 ^a	5,59 ^a
Filant à la fourchette	N.S.	5,74 ^a	5,93 ^a	5,88 ^a	N.S.	5,88 ^a	5,93 ^a
Coutchouteux	***	3,13 ^a	3,89 ^b	5,00 ^c	N.S.	4,33 ^a	4,56 ^a
Texture fondante	***	4,89 ^a	4,48 ^a	3,25 ^b	N.S.	3,86 ^a	3,88 ^a
Gras en bouche	N.S.	2,93 ^a	2,86 ^a	3,13 ^a	N.S.	2,99 ^a	3,00 ^a
Granuleux	N.S.	1,19 ^a	1,20 ^a	1,59 ^a	N.S.	1,28 ^a	1,52 ^a
Intensité globale du goût	N.S.	5,43 ^a	5,09 ^a	5,33 ^a	N.S.	5,23 ^a	5,19 ^a
Salé	N.S.	3,29 ^a	3,18 ^a	2,99 ^a	N.S.	3,24 ^a	2,92 ^a
Acide/lactique	***	4,19 ^a	3,40 ^b	3,02 ^b	N.S.	3,17 ^a	3,25 ^a
Beurré/lacté	N.S.	4,16 ^a	4,43 ^a	4,21 ^a	N.S.	4,24 ^a	4,39 ^a
Animal/étable	N.S.	1,21 ^a	0,79 ^a	1,14 ^a	N.S.	0,93 ^a	1,01 ^a
Amer	***	2,00 ^a	1,27 ^b	1,28 ^b	N.S.	1,38 ^a	1,16 ^a
Piquant	N.S.	1,08 ^a	0,79 ^a	0,83 ^a	N.S.	0,81 ^a	0,81 ^a
Persistance du goût	*	4,73 ^a	4,11 ^b	4,51 ^{ab}	N.S.	4,44 ^a	4,18 ^a

^{a-c} : Des lettres différentes sur une même ligne indiquent une différence significative entre les trois niveaux ou entre les deux modes de délactosage (P < 0,05).

Sign. : significativité du modèle avec N.S. = non significatif, * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001

La Figure 70 présente l'analyse par ACP des liens entre les descripteurs sensoriels à chaud et les niveaux de délactosage avec 37,44 % de l'information apportée par les deux axes. Cette figure montre que les descripteurs sensoriels à chaud ne permettent pas de discriminer les niveaux de délactosage.

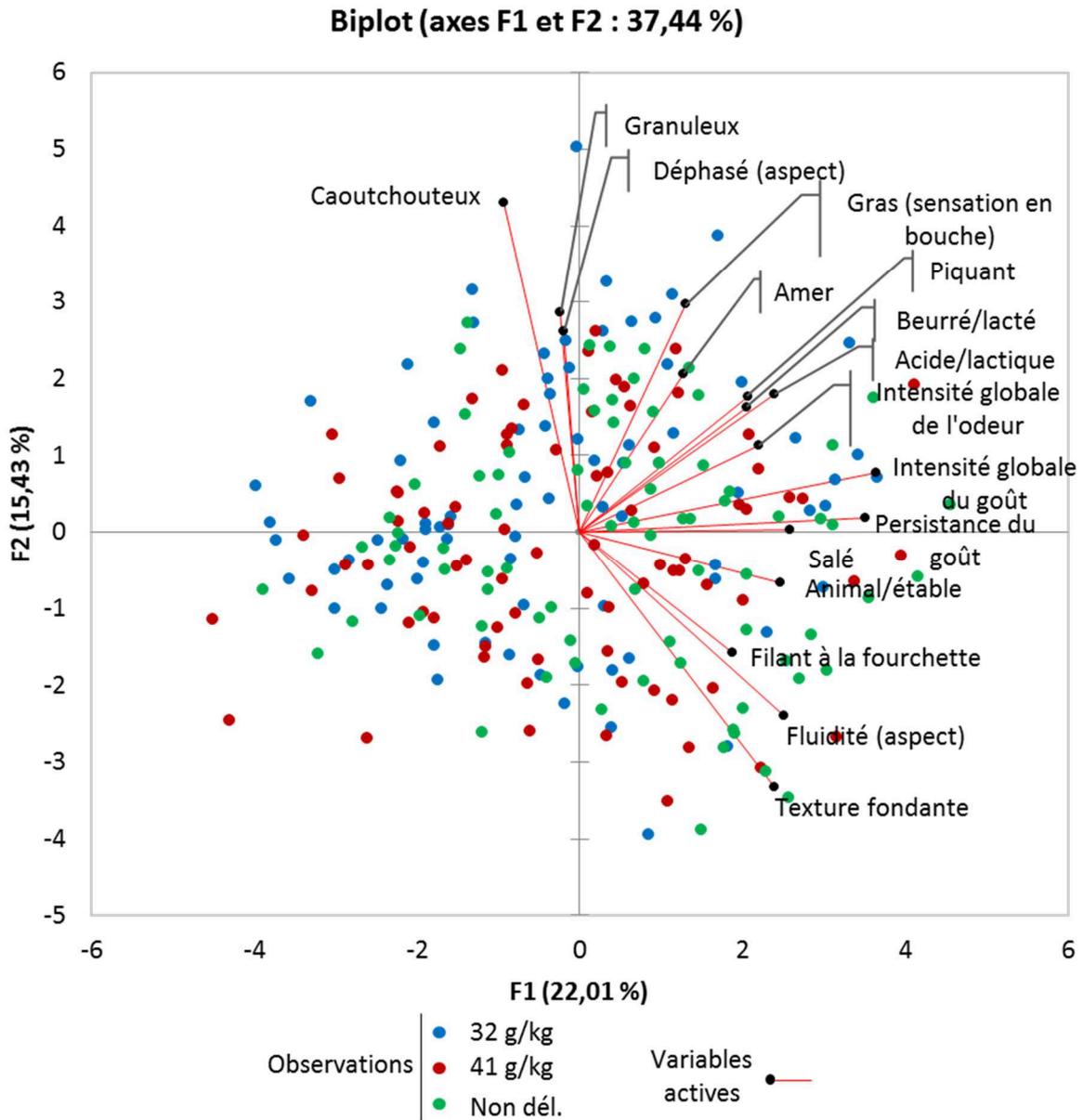


Figure 70 : Représentation par ACP des descripteurs sensoriels étudiés à chaud par rapport aux niveaux de délactosage.

Les liens entre les paramètres de délactosage, les variables explicatives et les descripteurs sensoriels à chaud ont été analysés par ACP dans la Figure 71. Environ 47 % de l'information sont représentés sur les deux 1^{ers} axes de l'ACP dont l'axe F1 (36,17 %) permet de distinguer

les fromages selon le niveau de délactosage (Figure 71 (a)), (Figure 71 (b)). Le descripteur de texture « caoutchouteux » plus élevé caractérise les fromages 32 g/kg et est positivement corrélé avec le pH à J60, la teneur en Ca INSOL à 48 h et l'indice de protéolyse NS/NT. La matrice de ces fromages est perçue « caoutchouteuse » probablement car l'étude des aptitudes culinaires a démontré qu'elle est plus résistante que les fromages Non dél. et 41 g/kg. Cette résistance est due à la plus forte concentration en Ca INSOL et aux peptides hydrophobes qui augmentent le nombre et la force des interactions dans la matrice. À l'opposé de ce descripteur se trouve la texture fondante, qui caractérise les fromages Non dél. et 41 g/kg dont la matrice est moins résistante à l'étirement, plus apte à s'étaler et donc plus fondante. Le descripteur « aspect déphasé » est au centre de l'ACP car il n'est corrélé avec aucune des variables affectées par le niveau de délactosage. Ce sont les fromages LS>E qui présentent un aspect plus déphasé que les fromages LS=E, faisant écho à la quantité plus importante d'huile exsudée, qui serait due à l'endommagement de la membrane des globules gras par ce mode de délactosage.

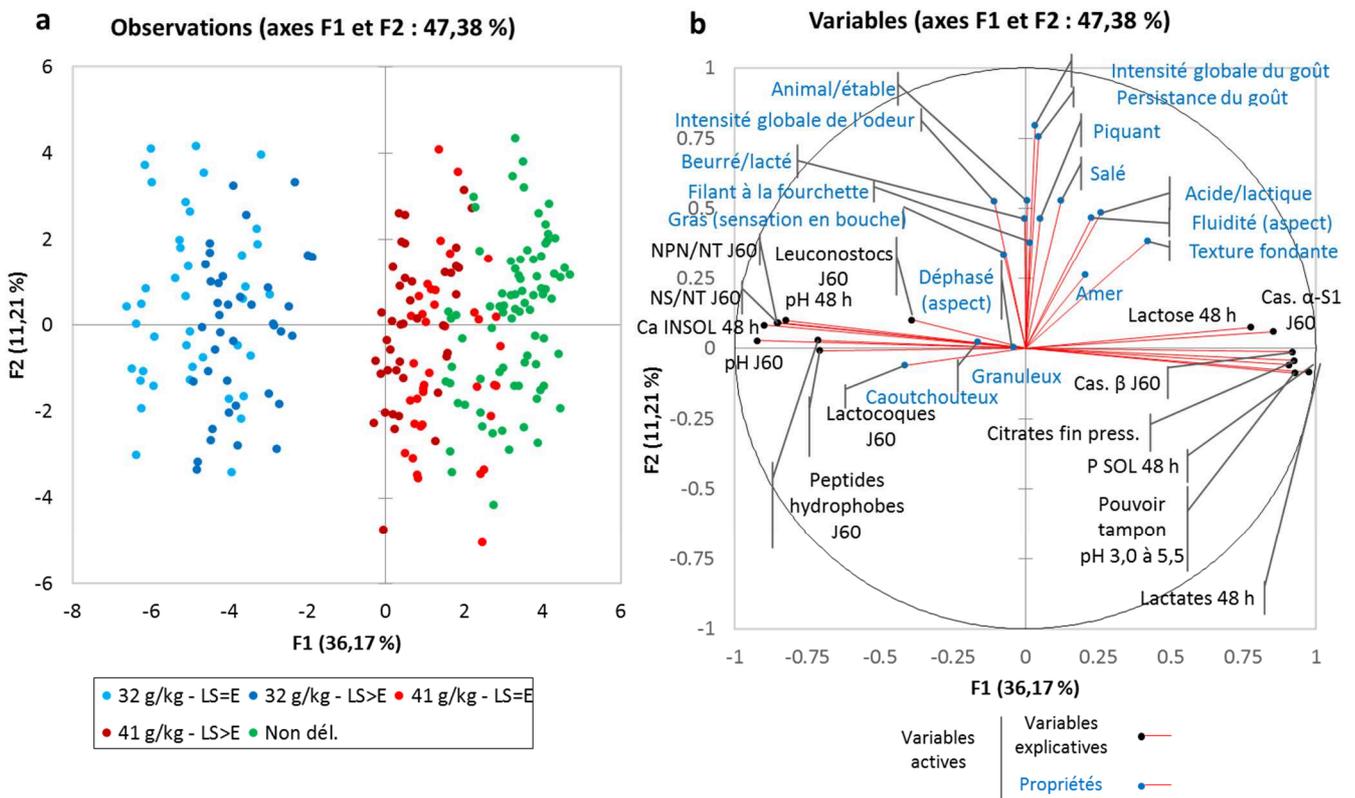


Figure 71 : Représentation par ACP des paramètres de délactosage (a) et des descripteurs sensoriels à chaud ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le délactosage (b).

Analysés à chaud, les descripteurs sensoriels sont moins affectés par le délactosage qu'à froid, probablement parce que le chauffage du fromage a neutralisé les molécules aromatiques. Les descripteurs « acide/lactique » et « amer » sont affectés significativement par le niveau de délactosage et voient leur perception diminuer avec le niveau. À chaud, l'augmentation du niveau de délactosage génère une texture caoutchouteuse, qui reflète la résistance de la matrice mesurée avec les propriétés fonctionnelles.

Chapitre 4

Conclusion générale et perspectives

1 Conclusion générale

Le délactosage est une pratique couramment utilisée en industrie fromagère dans le champ des fromages à pâte pressée non cuite tels que la Raclette et parfois également dans certaines variétés de fromages à pâte pressée cuite comme l'Emmental. La pratique la plus courante (celle étudiée dans le cadre de cette thèse) consiste à enlever une partie du lactosérum dans la cuve de fromagerie et à ajouter de l'eau en plus ou moins grande quantité afin notamment, de réguler la cinétique d'acidification lors de la transformation fromagère. Cependant, les mécanismes associés à cette pratique ne sont pas toujours bien perçus par les industriels fromagers. L'étude bibliographique a montré que certaines questions liées au délactosage (niveau et mode) restaient encore à explorer depuis la cuve de fromagerie jusqu'au fromage affiné. Ainsi, peu de connaissances existaient, voire paraissaient contradictoires, sur l'impact du délactosage sur la composition de la phase aqueuse du caillé en cuve, ainsi que sur le déroulement de l'affinage et sur les phénomènes induits par le délactosage impactant les propriétés fonctionnelles et sensorielles des fromages affinés.

L'objectif de cette thèse était donc d'apporter des connaissances sur les mécanismes induits par le délactosage contribuant aux propriétés fonctionnelles et sensorielles de fromages à pâte pressée non cuite, en s'attachant à étudier l'impact du délactosage sur les premières étapes de la transformation fromagère (caillé en cuve jusqu'au début de l'affinage) sachant que les caractéristiques initiales du fromage (début affinage) conditionnent les caractéristiques finales des fromages à pâte pressée non cuite tels que la Raclette.

Dans un premier temps, pour répondre à la question au sujet de l'impact du délactosage sur la composition du caillé en cuve, un verrou était à lever concernant **le prélèvement du caillé et sa stabilisation afin de préserver sa composition du moment du prélèvement et afin de l'analyser de manière reproductible**. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de lever ce verrou et de proposer les paramètres suivants :

– *Temps de tamisage et volumes de prélèvement permettant une séparation reproductible du caillé et du LEG* : Des échantillons de 1 L avant délactosage et de 2 L après délactosage ont

été prélevés lors des fabrications fromagères et le caillé (dont LIG) et le LEG ont été séparés en tamisant l'échantillon de caillé-lactosérum pendant 65 s.

– *Stabilisation et sous-échantillonnage du caillé tamisé* : Après avoir été tamisé, le caillé est immédiatement refroidi dans la glace fondante pendant 10 min, ce qui lui permet d'atteindre la température de ~15 °C. Ce refroidissement est une première étape de stabilisation permettant de réduire la synérèse et de rigidifier la matière grasse. Le caillé est ensuite mixé 2x10 s à vitesse 10 avec un mixeur Thermomix®. Après mixage, le caillé est immédiatement réparti en sous-échantillons qui sont immédiatement stockés dans la glace fondante pour leur transport en vue d'une analyse ou d'un stockage à 4 °C.

- *Prélèvement du mélange caillé-lactosérum de manière à optimiser la reproductibilité de son prélèvement* : Le mélange caillé-lactosérum a été prélevé en immergeant le pichet dans la cuve jusqu'à mi-hauteur du contenu de la cuve. Ce prélèvement se fait dans le sens horaire de la cuve juste après le passage du brasseur périphérique de la cuve. Afin d'avoir des prélèvements reproductibles, il est conseillé que cela soit la même personne qui réalise les prélèvements du mélange caillé-lactosérum.

- *Détermination du moment de la fabrication pour observer l'impact du délactosage sur la composition du mélange caillé-lactosérum* : Notre postulat était que le moment le plus pertinent pour observer l'impact du délactosage en cuve était la fin de l'équilibration des solutés entre LIG et LEG en réponse au délactosage. Cette équilibre a été estimé avec l'évolution du lactose seul et à partir de ce résultat, il a été décidé de prélever l'échantillon « après délactosage » 15 minutes après le début du chauffage de la cuve.

Cette méthodologie mise au point en première partie de la thèse a été mise en œuvre lors des fabrications expérimentales menées en seconde partie de la thèse. Par ailleurs, cette méthodologie propose une approche universelle pouvant être utilisée pour étudier la composition du caillé dans d'autres transformations fromagères. Elle a fait l'objet d'un article intitulé « *A strategy to assess the sieving time of curd sampled during cheese manufacture to separate curd from whey* », accepté dans la revue *International Journal of Dairy Technology* (Annexe 16).

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à **comprendre par quels mécanismes le délactosage contribue au développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles d'un fromage à pâte pressée non cuite, la Raclette.**

Tout d'abord comme énoncé plus haut, il était important de connaître les impacts du délactosage sur la composition du caillé en cuve et **leurs conséquences sur les caractéristiques du fromage au démoulage.**

Pour répondre à cette problématique, des expérimentations fromagères ont été mises en oeuvre en étudiant deux paramètres de délactosage : le niveau et le mode. Pour le niveau de délactosage, nous avons sélectionné trois niveaux correspondant à des taux de lactose différents : un témoin sans délactosage et deux autres niveaux, 41g/kg et 32g/kg de lactose ; les niveaux « sans délactosage » et « 32 g/kg » étant des niveaux extrêmes et le niveau « 41 g/kg » étant un niveau intermédiaire. Deux modes de délactosage les plus fréquemment utilisés en industrie avaient été choisis : 1) la quantité de lactosérum retirée est supérieure à la quantité d'eau ajoutée ; 2) la quantité de lactosérum retirée est égale à la quantité d'eau ajoutée.

Ainsi, nous avons montré au cours de cette thèse que la très grande majorité des différences de composition observées au démoulage étaient dues au paramètre « niveau de délactosage ». Les impacts des deux paramètres ont été schématisés dans la Figure 72.

Ainsi, l'élimination des composés solubles augmente avec le niveau de délactosage. Cet impact est lié à deux phénomènes : **l'égouttage**, qui entraîne l'élimination des solutés en même temps que le LIG du caillé et **la différence de pression osmotique** créée par la dilution entre le LIG et le LEG, entraînant le transfert des solutés du LIG vers le LEG. L'augmentation de l'élimination des solutés en lien avec le niveau de délactosage a eu tendance à faire diminuer l'ESD du caillé et du fromage et à entraîner une diminution significative du rendement fromager (Figure 72). Le principal soluté affecté par la dilution a été le lactose car 1) il est un composé majeur du lactosérum en termes de concentration et 2) les impacts du délactosage ont majoritairement été liés à ce composé. Cependant, d'autres solutés sont affectés par la dilution. En effet, le délactosage a entraîné une diminution de la part de Ca et de P solubles sur le Ca total et le P total dans le LIG du caillé au cours de la fabrication. Néanmoins, cet impact n'a pas été suffisamment important pour affecter significativement le

Ca et le P total au démoulage. Les citrates ont également été affectés par le dé lactosage car des différences significatives de concentration entre les trois niveaux sont apparues entre le dé lactosage et la fin du pressage. Au démoulage la consommation des citrates par les bactéries lactiques (souches de *Lc. Lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* et de *Leuconostoc*) a lissé les différences, générant des concentrations en citrates similaires au démoulage. Par ailleurs, comme différentes quantités de citrates ont été consommées, nous pouvons supposer que différentes quantités de molécules aromatiques (*i.e.* diacétyle) ont pu être produites avec un impact potentiel sur le goût des fromages. Au démoulage, une diminution des activités protéasiques acides a été observée dans les fromages 32 g/kg et ce résultat suggère qu'un niveau de dé lactosage élevé a diminué la concentration de coagulant résiduel. En revanche, l'activité du système plasmine/plasminogène n'a pas été affectée par le dé lactosage indiquant que l'augmentation du niveau de dé lactosage n'a pas entraîné d'élimination accrue des inhibiteurs d'activateurs de plasminogène comme suggéré par Vélez *et al.* (2016).

Au démoulage, les principaux impacts du dé lactosage étaient liés à l'élimination du lactose. Plus le niveau était élevé et plus la concentration en sucres, glucose et galactose issus de l'hydrolyse du lactose, était faible. La limitation de la concentration en sucres fermentescibles a entraîné une baisse de la production d'acide lactique et induit des différences de pH avant le démoulage entre les fromages 32 g/kg et les fromages dont la fermentation a continué jusqu'au démoulage (Non dél. et 41 g/kg) (Figure 72). La baisse de la production d'acide lactique a aussi entraîné une diminution du pouvoir tampon du fromage au démoulage en limitant la présence de lactates tamponnant autour de pH 3,9 (Figure 72). En effet, l'absence de différences de concentration en protéines et en phosphore au démoulage suggère que la diminution du pouvoir tampon est due principalement à la diminution de la concentration en lactates (Figure 72). D'autre part, le niveau de dé lactosage a pu entraîner une diminution de la quantité de protéines sériques tamponnant autour de pH 3-4 mais ce lien n'a pas été établi. Comme nous le verrons plus loin, ce pouvoir tampon plus faible dans les fromages 32g/kg a occasionné une remontée de pH plus rapide durant l'affinage impactant certains phénomènes biochimiques et *in fine* les caractéristiques finales des fromages.

Le mode de dé lactosage n'a pas eu d'impact significatif sur la composition des fromages. Toutefois, il a affecté significativement la microstructure du fromage, en particulier l'intégrité des globules gras, dont la membrane lipoprotéique a été plus endommagée dans les fromages LS>E (Figure 72). Ce mode a probablement fait subir des contraintes supplémentaires au caillé

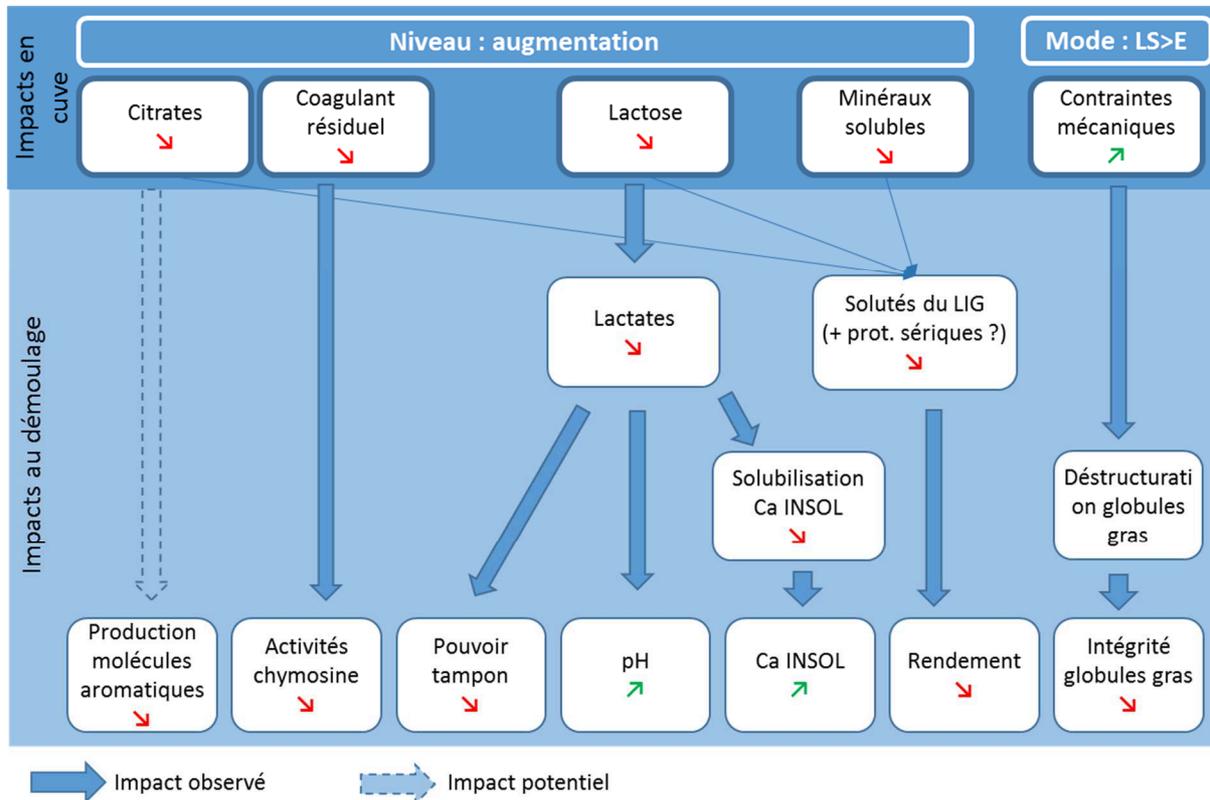


Figure 72 : Schéma des impacts du niveau et du mode de dé lactosage sur les propriétés du fromage et le rendement au démoulage.

en cuve et ainsi affecté sa microstructure. Cet impact peut être relié à la tendance du mode LS>E à entraîner une diminution de la récupération de la MG. Par ailleurs, le mode LS>E permet de diminuer la quantité d'eau utilisée pour atteindre un niveau de dé lactosage et ainsi réduire la quantité de lactosérum à prendre en charge en fin de fabrication. L'adaptation du mode de dé lactosage présente donc une perspective économique intéressante.

En conséquence des effets observés en début d'affinage, le niveau de dé lactosage a été le principal paramètre affectant **le déroulement de l'affinage des fromages**. Dans le cadre de notre étude, c'est-à-dire à teneurs en MS et MG similaires dans tous les fromages, **l'impact central de ce paramètre de dé lactosage s'est porté sur le pH**. Ainsi, les fromages les plus dé lactosés ayant eu un pH plus élevé et étant moins tamponnés ont vu leur pH augmenter plus rapidement pendant l'affinage et atteindre un pH plus haut à 60 jours (fin d'affinage) (Figure

73). Cette augmentation du pH beaucoup plus rapide dans les fromages 32 g/kg est due à une augmentation de la vitesse de protéolyse libérant des molécules alcalines. La principale protéase affectée par l'augmentation du pH était la plasmin (protéase alcaline), ce que nous avons pu voir au travers de la dégradation des caséines β et α_{S2} . Néanmoins, la dégradation accrue des caséines α_{S1} suggère que l'activité d'autres protéases alcalines, probablement d'origine bactérienne, a pu être favorisée par l'augmentation du pH. En accord avec cette hypothèse, l'augmentation du niveau de dé lactosage a entraîné une diminution moins rapide des populations de bactéries lactiquesensemencées au cours de l'affinage (Figure 73). Une diminution des activités protéasiques aspartiques dans les fromages 32 g/kg avait été observées au démoulage mais cet impact n'a pas eu d'effet visible sur la protéolyse car ces fromages sont les plus protéolysés. Par ailleurs, l'augmentation importante de la protéolyse dans les fromages 32 g/kg par rapport aux autres niveaux a favorisé la libération de grands peptides hydrophobes susceptibles de contribuer aux propriétés élastiques de la matrice (Figure 73).

Chapitre 4 : Conclusion générale et perspectives

Le mode de dé lactosage n'a présenté qu'un seul impact visible en fin d'affinage, qui est la déstructuration des globules gras, observé au microscope confocal, confirmant les observations réalisées au démoulage (Figure 73).

La Raclette étant un fromage consommé sous forme fondue (principalement) et à température ambiante, les **propriétés fonctionnelles** mesurées à chaud (=aptitudes

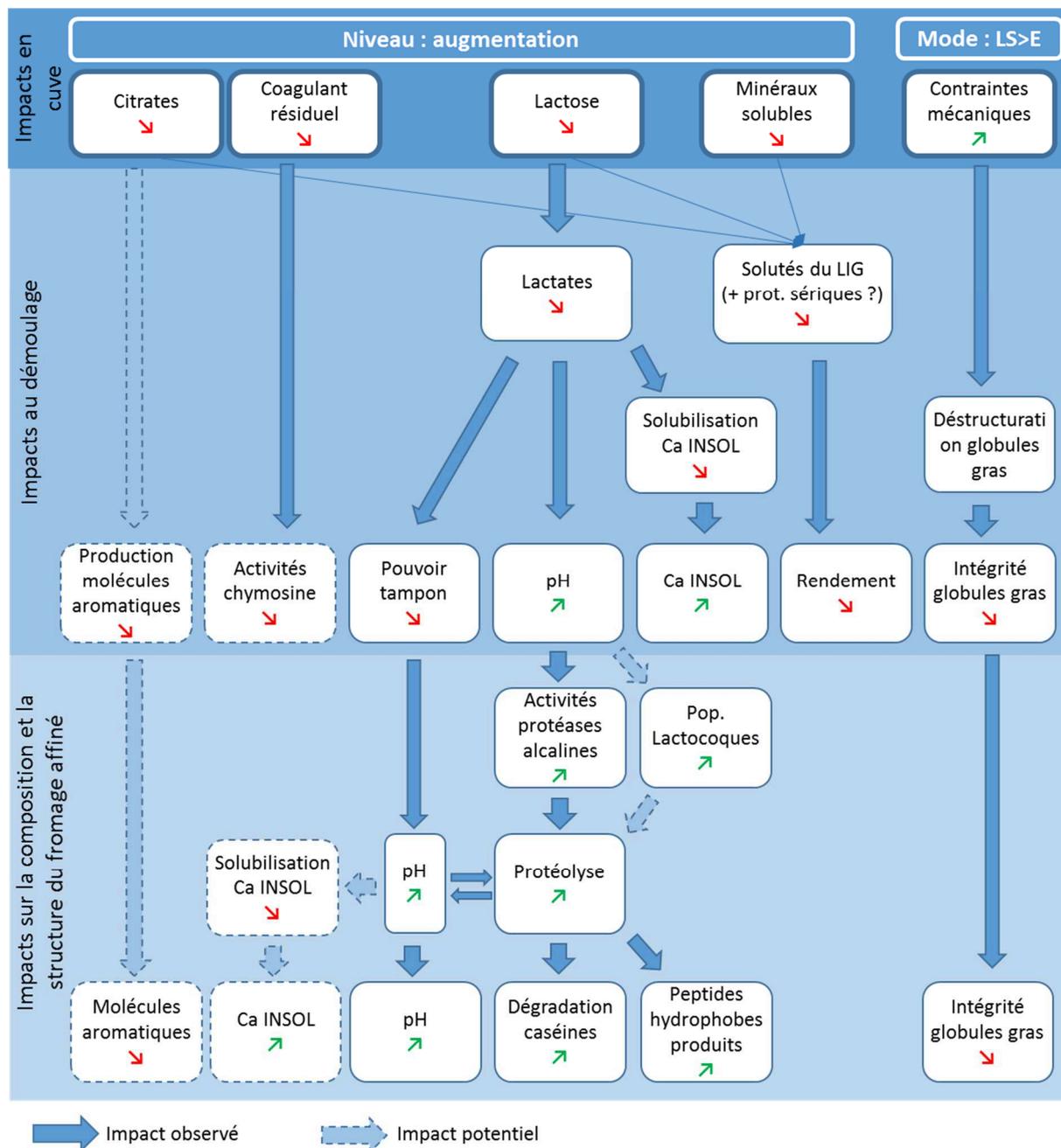


Figure 73 : Schéma des impacts du niveau et du mode de dé lactosage sur le déroulement de l'affinage du fromage.

culinaires) et à température ambiante sont des éléments essentiels caractérisant ce fromage, sans toutefois négliger ses **propriétés sensorielles**, facteur de spécificité.

Ainsi, dans le cadre de notre étude, c'est-à-dire à teneur en MS et MG similaires dans tous les fromages, trois types de variables ont contribué directement au développement des propriétés fonctionnelles : le pH, la protéolyse et le Ca INSOL. D'une part, un niveau de délactosage élevé diminue le nombre et la force de certaines interactions entre caséines *via* la protéolyse et *via* le pH qui augmentent la répulsion électrostatique. Ces impacts ont favorisé le développement d'une matrice souple et déformable à température ambiante (Figure 74). D'autre part, un niveau de délactosage élevé augmente le nombre et la force d'autres types d'interactions entre les caséines, en favorisant une teneur en Ca INSOL élevée dans la matrice en augmentant les interactions hydrophobes *via* la libération de grands peptides hydrophobes. Ces impacts ont favorisé le développement d'une matrice résistante et donc déformable à froid, et résistante à l'étirement à chaud, avec une texture qualifiée de plus caoutchouteuse (Figure 74).

L'effet du niveau de délactosage sur certaines variables n'a pas pu être expliqué avec les moyens analytiques dont nous disposons et nécessite un approfondissement pouvant améliorer la maîtrise des propriétés des fromages liées au délactosage. Par exemple, le délactosage a diminué l'intensité globale de la flaveur du fromage et plusieurs descripteurs pourraient être liés à des acides aminés vecteurs d'arômes ou de saveurs spécifiques. Des études précédentes ont également rapporté une diminution globale de la flaveur du fromage liée à une modification du profil d'acides aminés. Cependant, le niveau de délactosage ayant favorisé la protéolyse, et donc la libération potentielle de petits peptides et d'acides aminés vecteurs de flaveur, il est étonnant que l'augmentation du niveau de délactosage ait entraîné la diminution globale de l'intensité de la flaveur du fromage. De plus, les acides gras volatils sont liés au métabolisme des lipides et la rupture de la membrane des globules gras par le mode LS>E était susceptible d'avoir affecté cette voie métabolique en favorisant l'accès des enzymes lipolytiques aux lipides. Une diminution de la concentration en citrates du fromage et donc potentiellement une diminution de la production de molécules aromatiques liées à la dégradation des citrates a été observée à la fin du pressage. Cependant, peu de liens entre les descripteurs de flaveur affectés et la diminution de la concentration en citrates ont pu être

établis. Une étude approfondie des différentes voies biochimiques menant à la production de molécules aromatiques serait donc nécessaire pour expliquer les impacts du dé lactosage sur la saveur du fromage.

L'impact du dé lactosage sur la teneur en Ca INSOL n'a pu être déterminée que jusqu'au point à 48 h ; elle nous a tout de même permis d'estimer l'impact de cette variable sur le développement des propriétés fonctionnelles en fin d'affinage. Cependant, des études précédentes ont montré que la cinétique de solubilisation du Ca INSOL pendant l'affinage pouvait différer en fonction des paramètres de fabrication du fromage (Lee *et al.*, 2010, 2011). Ainsi, les différences de teneurs en Ca INSOL en fin d'affinage pourraient ne pas être représentatives des différences observées au démoulage. Pour cette raison, il serait nécessaire de confirmer l'impact du niveau de dé lactosage sur la teneur en Ca INSOL en fin d'affinage par une étude complémentaire afin d'étayer les mécanismes de développement des propriétés fonctionnelles soutenus dans cette thèse.

Peu d'impacts du mode de dé lactosage sur les propriétés du fromage ont été observés durant la thèse. Le mode LS>E a entraîné une augmentation des contraintes mécaniques sur le caillé en cuve affectant l'intégrité des globules gras de la matrice. L'endommagement des globules gras jouait sur les propriétés du fromage affiné, se traduisant par une exsudation de matière grasse et un aspect hétérogène (Figure 74). Néanmoins, l'utilisation du mode LS>E est susceptible de réduire la quantité d'eau nécessaire pour atteindre un niveau de dé lactosage, et par conséquent la quantité de lactosérum à prendre en charge en fin de fabrication, comparé au mode LS=E.

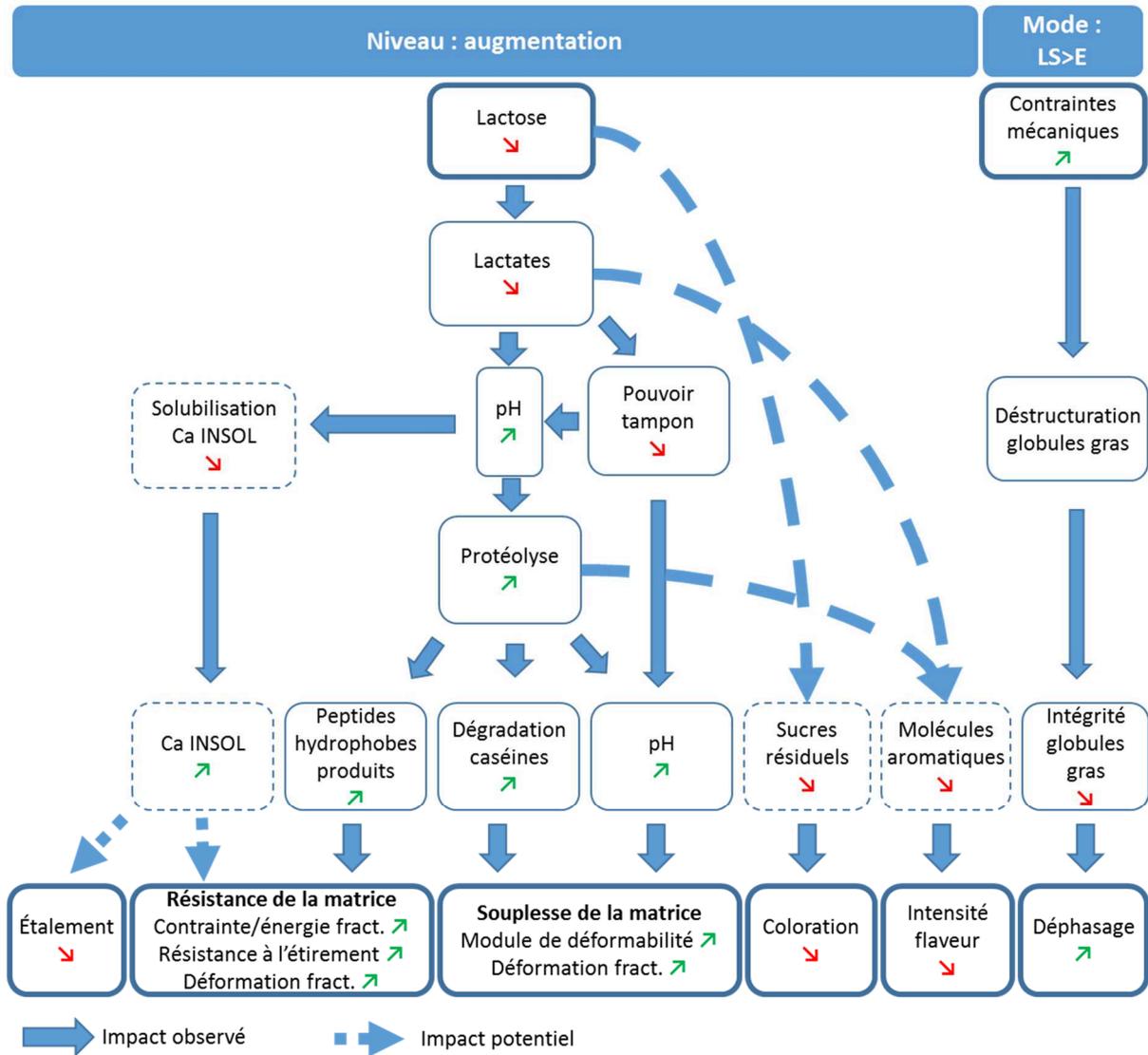


Figure 74 : Schéma des impacts du niveau et du mode de délactosage sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné.

2 Perspectives

Cette thèse a permis de décrire les mécanismes par lesquels le délactosage contribue au développement des propriétés fonctionnelles du fromage et de déterminer le rôle de deux paramètres de délactosage : le niveau et le mode. Le mode de délactosage a peu d'impacts sur les propriétés du fromage, ce qui ouvre la perspective de l'adapter de manière à optimiser économiquement cette étape de la fabrication. Les mécanismes de développement de propriétés fonctionnelles étudiées à chaud et à température ambiante ont été décrits et les variables contribuant majoritairement à ces développements ont été identifiées. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons montré que **le pH et le pouvoir tampon qui le module sont**

les impacts majeurs du niveau de délactosage qui conditionnent le développement des propriétés fonctionnelles via la solubilisation du Ca INSOL et la protéolyse. L'identification des impacts par lesquels le délactosage contribue au développement des propriétés fonctionnelles ouvre la perspective de moduler les propriétés du fromage affiné en utilisant le niveau de délactosage comme levier. Cependant, certains impacts n'ont pas été étudiés tels que l'impact du délactosage sur l'évolution de la teneur en Ca INSOL au cours de l'affinage ou sur le développement de la flaveur du fromage, qui peuvent constituer d'autres leviers d'amélioration. D'autres paramètres du délactosage, tels que le moment du délactosage par rapport à l'acidification ou l'impact d'un délactosage réalisé en deux étapes (Verschuere *et al.*, 2002) pourraient constituer d'autres leviers d'amélioration des qualités du fromage ou d'optimisation économique.

Plusieurs mécanismes par lesquels le niveau de délactosage affecte le développement des propriétés fonctionnelles du fromage ont été décrits dans la thèse et les principales variables affectées ont été identifiées pour plusieurs propriétés. Ces résultats ouvrent la perspective de prédire le développement de certaines propriétés fonctionnelles à partir des caractéristiques du fromage au démoulage, c'est-à-dire au moment où l'égouttage est proche de la fin. Plusieurs caractéristiques au démoulage ont été choisies pour la conception de modèles de prédiction en fonction de leur influence sur le déroulement de l'affinage :

- **Sucres totaux** : représentent le potentiel de fermentation du fromage et donc la quantité potentielle d'acide lactique pouvant être produit pendant l'affinage et donc la quantité de protons participant à l'évolution du pH.
- **Acide lactique** : représente la quantité de protons déjà présents dans la matrice, qui conditionnent le pH au démoulage et qui interagissent avec les composants tampons.
- **Capacité tampon (pH 3,0 à 5,5)** : zone de capacité tampon affectée par le niveau de délactosage, la capacité tampon est une variable importante car elle conditionne la vitesse d'augmentation du pH.
- **pH** : il conditionne les réactions chimiques et enzymatiques dès le démoulage ; il est donc une variable importante pour l'explication de la cinétique de solubilisation du Ca INSOL et de la vitesse de protéolyse.
- **Ca INSOL** : il décrit la minéralisation de la matrice au démoulage, point de départ de la cinétique de solubilisation du Ca INSOL pendant l'affinage.

Ces variables ont été utilisées pour créer des modèles de prédiction par régression par les moindres carrés (PLS) (Tableau 32). Les variables utilisées pour chacun de ces modèles ont été choisies de manière à optimiser la racine de la moyenne des carrés des erreurs (RMCE) avec un minimum de variables.

Tableau 32 : Coefficient de détermination, racine de la moyenne des carrés des erreurs (RMCE) et RMCE normalisé des propriétés fonctionnelles modélisées par PLS en fonction des variables mesurées au démoulage.

Propriétés	R2	RMCE	RMCE normalisé (% de la moyenne)	Formules
Module de déformabilité	0,90	64,72	19,87	$974,55 + 106,24 * [\text{Sucres}] + 2,79E-02 * [\text{Acide lactique}] + 1529,19 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}] - 387,00 * [\text{pH}]$
Déformation à la fracture	0,95	0,05	11,36	$2,19 - 5,30E-02 * [\text{Sucres}] - 7,34E-05 * [\text{Acide lactique}] - 1,25 * [\text{Ca INSOL}] - 3,91 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}] + 0,37 * [\text{pH}]$
Énergie à la fracture	0,85	3,31	14,99	$67,18 - 1,96 * [\text{Sucres}] - 1,50E-03 * [\text{Acide lactique}] + 57,07 * [\text{Ca INSOL}] - 87,73 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}]$
Contrainte à la fracture	0,85	12,61	11,79	$767,95 + 6,94 * [\text{Sucres}] - 9,72E-03 * [\text{Acide lactique}] + 362,06 * [\text{Ca INSOL}] - 543,08 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}] - 80,06 * [\text{pH}]$
Filant	0,57	131,93	48,02	$3561,75 - 100,09 * [\text{Sucres}] - 2,36E-02 * [\text{Acide lactique}] + 2454,51 * [\text{Ca INSOL}] + 942,98 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}] - 835,04 * [\text{pH}]$
Force d'extrusion	0,76	0,14	15,19	$-1,69 - 5,09E-02 * [\text{Sucres}] - 3,71E-05 * [\text{Acide lactique}] + 1,39 * [\text{Ca INSOL}] - 2,25 * [\text{CT pH 3,0} \rightarrow \text{pH 5,5}] + 0,75 * [\text{pH}]$

Les propriétés les plus prédictibles sont la déformation à la fracture et la contrainte à la fracture qui traduisent la déformabilité et la résistance de la matrice, avec un coefficient de détermination supérieur à 80 % et une RMCE, qui représente la variabilité de la prédiction autour de 11 % par rapport à la moyenne de l'ensemble des données de chacune des deux propriétés.

Les variables explicatives utilisées pour la conception de ces modèles varient avec le niveau de délactosage. **Dans la pratique, c'est donc le niveau de délactosage qui doit être ajusté pour moduler les propriétés fonctionnelles du fromage** *via* les variables explicatives mesurées au démoulage et présentées précédemment. C'est pourquoi nous avons calculé des modèles de prédiction linéaires en fonction du niveau de délactosage, pour chacune des propriétés fonctionnelles affectées par ce paramètre (Tableau 33).

Tableau 33 : Coefficient de détermination, racine de la moyenne des carrés des erreurs (RMCE) et RMCE normalisé des propriétés fonctionnelles modélisées par régression linéaire en fonction du niveau de dé lactosage ([lactose] du caillé avant soutirage).

Propriétés	R ²	RMCE	RMCE normalisée (% de la moyenne)
Module de déformabilité	0,93	57,77	17,73
Déformation à la fracture	0,93	0,07	14,37
Énergie à la fracture	0,84	3,67	16,63
Contrainte à la fracture	0,66	20,13	18,84
Filant	0,64	104,84	38,15
Étalement	0,41	0,17	5,20
Force d'extrusion	0,78	0,14	15,15
a* (axe vert/rouge)	0,72	1,13	15,72
L* (clarté)	0,39	2,09	3,11

Les propriétés les plus prédictibles avec seulement le niveau de dé lactosage sont le module de déformabilité (rigidité), la déformation à la fracture (déformabilité), l'énergie à la fracture (résistance de la matrice), la force d'extrusion (résistance à l'étirement à chaud) et le paramètre colorimétrique a* (coloration vert/rouge). Ces propriétés ont un coefficient de détermination supérieur à 0,70 et une RMCE, qui représente la variabilité de la prédiction, autour de 15 % par rapport à la moyenne de chacune des données.

Tous ces modèles de prédiction font office de preuve de concept car ils ne sont pertinents que dans le cadre de notre étude, c'est-à-dire pour la fabrication de la variété fromagère que nous avons étudiée et en fixant les teneurs en MS et MG. De plus, ce sont des modèles théoriques qui nécessitent une validation expérimentale pour pouvoir en faire un outil opérationnel. Cependant, ces modèles mettent en valeur les variables au démoulage pouvant expliquer le développement de certaines propriétés fonctionnelles. Ces modèles reflètent également la possibilité de contrôler certaines propriétés fonctionnelles du fromage avec le niveau de dé lactosage lorsqu'il est le seul paramètre ajusté.

Certains impacts du niveau de dé lactosage n'ont pas pu être expliqués par les analyses mises en œuvre dans cette étude et méritaient des approfondissements proposés ci-après.

- L'analyse du Ca INSOL est faite généralement en déduisant le Ca INSOL du Ca total et du Ca de la phase aqueuse du fromage. Cependant, l'extraction de la phase aqueuse est difficile à mettre en œuvre pendant l'affinage et nécessite une quantité trop importante d'échantillons,

que nous n'aurions pas pu fournir dans cette étude. Le Ca INSOL est une variable importante contribuant aux propriétés fonctionnelles du fromage qui nous a manqué pour confirmer les mécanismes décrits dans cette étude. Pour pallier la difficulté de l'analyse du Ca INSOL *via* l'extraction de la phase aqueuse, une alternative existe, consistant à estimer la teneur en Ca INSOL par l'analyse de son pouvoir tampon (Hassan *et al.*, 2004). L'utilisation de cette méthode permettrait dans des projets futurs d'approfondir les mécanismes de développement des propriétés fonctionnelles.

- Les travaux menés dans cette thèse ont permis de mettre en avant le rôle accru des protéases des bactéries lactiques dans le développement de la protéolyse des fromages les plus dé lactosés, ce que nous n'attendions pas forcément. Il serait ainsi intéressant d'approfondir les connaissances sur leur rôle dans la protéolyse de fromages comme la Raclette et par conséquent sur leurs propriétés fonctionnelles et sensorielles. De plus, l'impact du niveau de dé lactosage sur les propriétés de flaveur n'ont pas pu être expliquées avec les variables que nous avons mesurées. Il est probable que le dé lactosage ait affecté ces propriétés par un éventuel impact sur l'activité des bactéries lactiques du fromage et par conséquent sur le métabolisme des acides aminés tel que l'ont démontré Hou *et al.* (2014).

D'autres paramètres de dé lactosage pourraient être étudiés pour optimiser le contrôle des propriétés fonctionnelles du fromage ou la performance industrielle de cette étape de la fabrication.

Le moment de dé lactosage par rapport à l'acidification peut avoir un impact important sur les propriétés du fromage, notamment en affectant sa minéralisation. En effet, van den Berg & de Vries (1975) ont conclu que le dé lactosage entraînait une déminéralisation accrue du fromage. Ils l'expliquent par la dilution des composés tampons de la phase aqueuse par le dé lactosage, qui aurait diminué la neutralisation de l'acidité et donc induit la solubilisation en cuve du Ca INSOL. Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'impact du dé lactosage en cuve car l'acidification s'est déroulée en grande majorité entre la fin du pressage et le démoulage. Cependant, la vitesse d'acidification pouvant varier d'une fromagerie à l'autre, le dé lactosage est donc susceptible d'avoir un impact différent sur la solubilisation des minéraux. L'étude de l'impact du dé lactosage à différents pH pourrait permettre d'optimiser le contrôle

de la minéralisation du fromage et potentiellement le développement de ses propriétés fonctionnelles.

Le mode ayant eu peu d'impact sur les caractéristiques du fromage au démoulage et ses propriétés en fin d'affinage, il peut être adapté pour optimiser économiquement l'étape de délactosage. Dans ce sens, Verschueren *et al.* (2002) ont publié un article court mettant en avant la possibilité d'économiser 10 à 20 % d'eau et 10 à 15 % du temps nécessaire pour réaliser le délactosage avec un procédé en deux étapes. Le délactosage est donc réalisé deux fois de suite avec des quantités de lactosérum retiré et d'eau ajoutée identiques, permettant d'accélérer la diffusion du lactose vers le LEG en maximisant les différences de pressions osmotiques. Cette approche pourrait être adaptée avec le mode LS>E pour optimiser la quantité de ressources nécessaires pour réaliser le délactosage.

Selon la littérature, **le délactosage est parfois réalisé dans la fabrication de variétés de fromage à pâte pressée cuite et semi cuite**. Toutefois, les impacts de différents niveaux de délactosage ne semblent pas être clairement identifiés dans ces variétés. En effet certaines études démontrent une augmentation de la vitesse de protéolyse liée au délactosage (Vélez *et al.*, 2015) tandis que d'autres démontrent une diminution de la protéolyse liée au délactosage (Jaros *et al.*, 1997). De plus comme pour les fromages à pâte pressée non cuite, l'impact du délactosage sur l'évolution du Ca INSOL est peu connu et pourrait permettre d'optimiser les propriétés fonctionnelles des fromages à pâte pressée cuite et semi cuite. Par exemple, Jaros *et al.* (1997) ont corrélé le niveau de délactosage avec la contrainte et la déformation à la fracture, mais seule la protéolyse a été analysée et a permis d'expliquer ce mécanisme. La démarche utilisée dans la thèse pourrait inspirer de futures recherches dans le domaine des pâtes pressées cuites et semi cuites, dans lequel les mécanismes de développement des propriétés fonctionnelles et sensorielles liées au délactosage ne sont pas entièrement décrits.

Enfin, **des gains économiques liés à l'adaptation du mode de délactosage sont envisageables**.

Dans le cas de nos travaux, le remplacement du mode de délactosage LS=E par LS>E pour une fabrication de 310 L a permis de diminuer la quantité d'eau utilisée de 5 kg en moyenne pour

le niveau 41 g/kg et de 12 kg pour le niveau 32 g/kg. Pour représenter l'impact économique de ces différences à l'échelle industrielle, nous avons estimé le volume d'eau économisé annuellement par une usine transformant 500 000 L de lait par jour et achetant l'eau à 3,50 €/m³ (Tableau 34).

Tableau 34 : Volume d'eau économisé annuellement par un site transformant 500 000 L de lait par jour en remplaçant LS=E par LS>E.

	Volume économisé (m ³)	Économie (€)
41 g/kg	3 200	11 200
32 g/kg	6 800	23 800

La diminution du volume de lactosérum produit est équivalente à la quantité d'eau qui n'a pas été ajoutée à la cuve (Tableau 34). Le lactosérum est ensuite pris en charge pour être valorisé sous forme concentrée ou de poudre dans d'autres secteurs alimentaires comme la boulangerie et la pâtisserie, les compléments alimentaires ou les plats préparés. Cette prise en charge ne peut pas toujours être faite sur le site de la fabrication du fromage, elle comprend donc souvent une étape de transport du lactosérum. Cependant, pour diminuer la quantité de lactosérum à transporter, il est dans certains cas pré-concentré à 20 % de MS (6 % de MS au départ) (Bacenetti *et al.*, 2018). Les traitements du lactosérum pré-concentré sont ensuite aussi divers que ses utilisations possibles. Nous avons donc choisi d'estimer l'économie potentielle par rapport à la pré-concentration avant transport du lactosérum par trois procédés différents :

- L'évaporation TVR (thermal vapour recompression) est le procédé utilisé actuellement le plus coûteux en énergie, consommant entre 0,3 et 0,9 MJ/kg d'eau évaporée en fonction du nombre d'étapes d'évaporation (Ramirez *et al.*, 2006). Dans le cas d'une pré-concentration, nous estimons sa consommation à 0,4 MJ/kg, soit 0,11 kWh.
- L'évaporation MVR (mechanical vapour recompression) est le procédé d'évaporation le moins coûteux car l'intégralité de la vapeur générée est utilisée comme source d'énergie pour continuer le chauffage du produit. Sa consommation est de l'ordre de 0,1 MJ/kg d'eau évaporée, soit 0,03 kWh (Ramirez *et al.*, 2006).
- L'osmose inverse, qui est un procédé de filtration membranaire est le procédé le plus économique avec une consommation de 0,014-0,036 MJ/kg d'eau éliminé soit environ 0,01 kWh (Ramirez *et al.*, 2006).

En considérant que le site de production achète son électricité au tarif de 0,14 €/kWh, le coût de la consommation en électricité nécessaire en fonction du niveau de dé lactosage et du procédé de concentration utilisé est présenté dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Différence de coût de la consommation d'électricité nécessaire pour concentrer le lactosérum de 6 % de MS à 20 % de MS en fonction du niveau de dé lactosage et du procédé de concentration en remplaçant LS=E par LS>E.

	Différence (m ³)	Osmose inverse (€)	MVR (€)	TVR (€)
41 g/kg	3 200	800	3 000	13 000
32 g/kg	6 800	10 000	41 000	164 000

Ainsi, en remplaçant LS=E par LS>E, une usine transformant 500 000 L de lait par jour peut économiser annuellement 12 000 à 34 000 € par an si elle pré-concentre son lactosérum par osmose inverse ou économiser entre 24 000 à 188 000 € par an si elle pré-concentre son lactosérum par évaporateur TVR (Tableau 36).

Tableau 36 : Différence de coût total de mise en œuvre du dé lactosage en remplaçant LS=E par LS>E en fonction du niveau de dé lactosage et du procédé de concentration.

	Osmose inverse (€)	MVR (€)	TVR (€)
41 g/kg	12 000	14 000	24 000
32 g/kg	34 000	65 000	188 000

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Variétés fromagères concernées par le délactosage.

Fromages				Tps brassage ap. décaillage	Lactosérum retiré		Eau ajoutée		Tps de contact eau/caillé	Gestion du lactose	Auteurs
Technologies	Noms	Lait	Pays		%	T°C de la cuve	%	°C			
Fromage frais	Cream cheese	Vache	Pays Bas		50%		25%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Fromage frais	Cottage	Vache	Etats-Unis	2h	Jusqu'au niveau du caillé	53°C	jusqu'au niveau original	30°C 30°C 4°C	15 min 15 min 15 min	Rinçage du caillé	Chandan et Kilara 2011
Fromage frais	Cottage	Vache	Etats-Unis	2h	80% (x3)	60°C	80% (x3)	4°C		Rinçage du caillé	Wong et al. 1976
Soft	Sombor	Vache	Serbie				15-20% (Mouillage)			Mouillage Rinçage du caillé	Petrovic et al. 1986
Soft	Sombor	Vache	Serbie				Mouillage du lait (15% à 20%) Caillé pressé, redécoupé puis délactosé par trempage	30-35°C	20-30min	Mouillage Rinçage du caillé	Donnelly 2016
Soft	Sombor	Vache	Serbie	5-10min			Mouillage du lait (15% à 20%) Caillé pressé, redécoupé puis délactosage par trempage	30-35°C	20-30min	Mouillage Rinçage du caillé	Eugster-Meier et al. 2018
Soft	Tetilla	Vache	Spain			32°C	30%	36°C	Jusqu'à 6°D	Dilution du lactosérum	Centeno 2017
Soft	Urzúa-Ulloa	Vache	Espagne								Eugster-Meier et al. 2018
Soft	Vacherin Mont d'Or	Vache	France	Pas de brassage	10-25%		5-15% (Mouillage) 10-25%	Chaude	Jusqu'à 38°C	Mouillage Dilution du lactosérum	Ardö et al. 2018
Semi-soft	Butterkäse	Vache	Allemagne		50%	40-43°C	10%		45min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-soft	Gubbeen	Vache	Irlande								Donnelly, 2016
Semi-soft	Mimolette	Vache	France								Donnelly, 2016
Semi-hard	Amsterdammer	Vache	Pays-Bas		50%		27%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Asiago Pressato	Vache	Italy					Chaude	Jusqu'à 42°C	Dilution du lactosérum	Hartmann et al. 2018
Semi-hard	Appenzeller	Vache	Suisse	15-20min			10%-20%	Chaude		Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Brick cheese	Vache	Etats-Unis		40-45%		40-45%			Dilution du lactosérum	Foster et al. 1942
					50-55%		25-28%		Dilution du lactosérum		
					40-45%		50-55%		Dilution du lactosérum		
Semi-hard	Brick cheese	Vache	Etats-Unis	10min	50-55%	32°C	25-28% 50-55%	32°C	10min 10min 5min	Dilution du lactosérum	Cornett 1952
Semi-hard	Bukovina		Russie		8%	38-42°C	15%	50-60°C			Fox 1999
Semi-hard	Colby cheese	Vache	Etats-Unis	10-15min	100%	39°C	8,20%	10°C	5 min	Rinçage du caillé	Lee et al. 2011
							8,20%	10°C	7 min (durée du rinçage)	Rinçage du caillé	
Semi-hard	Colby cheese	Vache	Etats-Unis	10-15min	100%	39°C	16,80%	5°C	15 min	Rinçage du caillé	Lee et al. 2010
Semi-hard	Crowley	Vache	Etats-Unis								Donnelly, 2016
Semi-hard, bleu	Danablu	Vache	Danemark		20-25%		5%			Dilution du lactosérum	Belén Lopez Morales et al. 2018

OTW-S = One-time wash Symétrique

OTW-A = One-time wash Asymétrique

Annexes

Fromages				Tps brassage ap. décaillage	Lactosérum retiré		Eau ajoutée		Tps de contact eau/caillé	Gestion du lactose	Auteurs
Technologies	Noms	Lait	Pays		%	T°C de la cuve	%	°C			
Semi-hard	Danbo	Vache	Danemark		30-35%		15-25%			Dilution du lactosérum	Ardö et al. 2018
Semi-hard	Edam	Vache	Pays-Bas		50%		15%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Edam (export)	Vache	Pays-Bas		50%		3%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Edam (Loaf cheese)	Vache	Pays-Bas		50%		19%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Edam (Commissie)	Vache	Pays-Bas		50%		20%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Edam	Vache	Pays-Bas		45%	34°C	22%			Dilution du lactosérum	van den Berg et al. 1975
Semi-hard	Edam	Vache	Pays-Bas	15-30min	33-50%	31°C	33-50%	50-60°C	40min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-hard	Edam	Vache	Pays-Bas	15min	40%	31-33°C	40%		Jusqu'à 33-38°C	Dilution du lactosérum	Düsterhöft et al. 2018
Semi-hard	Esrom	Vache	Danemark		20-25%		10-20%		60 min	Dilution du lactosérum	Ardö et al. 2018
Semi-hard	Estonia		Ex-URSS		5%	38-42°C	15%	50-60°C		Dilution du lactosérum	Fox 1999
Semi-hard	Friesian cheese	Vache	Pays-Bas		50%		8%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		33% 50%		33% 50%	42°C 45°C		Dilution du lactosérum	Jovanovic et al. 2004
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		50%		17%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Gouda (export)	Vache	Pays-Bas		50%		6%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Gouda (Baby)	Vache	Pays-Bas		50%		26%			Dilution du lactosérum	Lolkema 1994
Semi-hard	Gouda/Edam	Vache	Pays-Bas		20% 40%	32°C	30% 50%			Dilution du lactosérum	Porcellato et al. 2016
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		40%	35,5°C	24%			Dilution du lactosérum	van den Berg et al. 1975
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas	20-30min	30%	28-30°C	suffisamment pour amener le mélange à 36-38°C	T°C < 80°C	ajout : 15-20min attente : 20-30min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas	15min	40%		40%		Jusqu'à 33-38°C	Dilution du lactosérum	Düsterhöft et al. 2018
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas	15min	50%		30%	48°C	30min	Dilution du lactosérum	Johnson et al. 1998
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		33%	31°C	22%	37,8°C	45min	Dilution du lactosérum	Spangler et al. 1991
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		33%	32,2°C	25%	38,9°C	25min	Dilution du lactosérum	Spangler et al. 1990
Semi-hard	Gouda	Vache	Pays-Bas		40%		40%			Dilution du lactosérum	Verschueren et al. 2002
Semi-hard	Grevé	Vache	Suède	2h	40%	30°C	40%		40min	Dilution du lactosérum	Hartmann et al. 2018
Semi-hard	Havarti	Vache	Danemark					Chaude	Jusqu'à 38°C	Dilution du lactosérum	Donnelly 2016

OTW-S = One-time wash Symétrique

OTW-A = One-time wash Asymétrique

Annexes

Fromages				Tps brassage ap. décaillage	Lactosérum retiré		Eau ajoutée		Tps de contact eau/caillé	Gestion du lactose	Auteurs
Technologies	Noms	Lait	Pays		%	T°C de la cuve	%	°C			
Semi-hard	Havarti	Vache	Danemark	60min	20-25%		10-20%			Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Herrgard	Vache	Suède		30% 45%	33°C	35%	40°C	60min 25min 25min	Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
	Holland Bruskov		Ex-URSS		5%	38-42°C	15%	50-60°C		Dilution du lactosérum	Fox 1999
Semi-hard	Hollandse Geitenkaas	Chèvre	Pays-Bas	15min	40%		40%		Jusqu'à 33-38°C	Dilution du lactosérum	Düsterhöft et al. 2018
Semi-hard	Holland Kruglyi		Ex-URSS		5%	38-42°C	15%	50-60°C		Dilution du lactosérum	Fox 1999
Semi-hard	Hohenheim Trappisten	Vache	Allemagne	45min	Jusqu'au niveau du caillé	35°C	jusqu'au niveau original	35°C	10-15min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-hard	Hohenheim Trappisten	Vache	Allemagne		30%		10-15%	30-35°C	20 min	Dilution du lactosérum	Ardö et al. 2018
Semi-hard	Jarlsberg	Vache	Norvège								Abrahamsen et al., 2006
Semi-hard	Kostroma		Ex-URSS		10%	38-42°C	15%	50-60°C		Dilution du lactosérum	Fox 1999
Semi-hard	Maasdammer	Vache	Pays-Bas		40%	30°C	jusqu'à 30% lactose restant		Jusqu'à 33-38°C	Dilution du lactosérum	Hartmann et al. 2018
Semi-hard	Maribo	Vache	Danemark								Scott et al. 1998
Semi-hard	Monterey	Vache	Etats-Unis	90-120min	Jusqu'à 2,5cm au dessus du caillé	39°C	suffisamment pour amener le mélange à 30°C	Froide	Jusqu'à 30°C (5min)	Rinçage du caillé	Scott et al. 1998
Semi-hard	Monterey (Faible %MG)	Vache	Etats-Unis		50%		50%	35°C	5 min	Dilution du lactosérum	Drake et al. 1995
Semi-hard	Monterey Jack	Chèvre	Etats-Unis	120min	Maximum	32°C	suffisamment pour amener le mélange à 30°C	Froide	5 min	Rinçage du caillé	van Hekken et al. 2004
Semi-hard	Morbier	Vache	France	5min	30%	32°C	20%	35	15min	Dilution du lactosérum	Buchin et al. 1998
Semi-hard	Murcia al vino	Chèvre	Espagne		15%	34°C	15%	Chaude		Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Murcia al vino	Chèvre	Espagne		15-20%	32°C	15-20%			Dilution du lactosérum	Tejada et al. 2008
Semi-hard	Norvegia	Vache	Norvège		45%	30,5°C	35%	35,5°C	25-30min	Dilution du lactosérum	Skeie et al. 2013
Semi-hard	Pategras	Vache	Argentine								Hartmann et al. 2018
Semi-hard	Pategras	Vache	Argentine		20%	35°C	20%	35°C	20-25 min	Dilution du lactosérum	Wolf et al. 2016
Semi-hard	Präst	Vache	Suède		40%	42°C	55%			Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Raclette (Valais)	Vache	Suisse			33°C	10-15%	Chaude		Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Raclette suisse	Vache	Suisse			32°C	30%	Chaude		Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Raclette	Vache	France			32°C	40%	30°C	30min	Dilution du lactosérum	Klantschitsch et al. 2000
Semi-hard	Reblochon	Vache	France								Donnelly, 2016

OTW-S = One-time wash Symétrique

OTW-A = One-time wash Asymétrique

Annexes

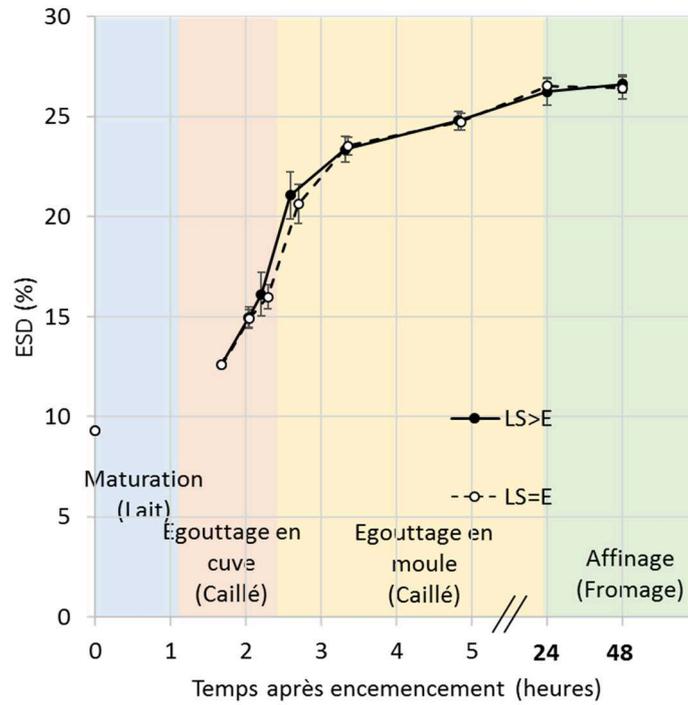
Fromages				Tps brassage ap. décaillage	Lactosérum retiré		Eau ajoutée		Tps de contact eau/caillé	Gestion du lactosérum	Auteurs
Technologies	Noms	Lait	Pays		%	T°C de la cuve	%	°C			
Semi-hard	Saint Paulin	Vache	France	5min	25% 50%	32,5°C	25% 50%			Dilution du lactosérum	Fournier 1992
Semi-hard	Saint Paulin	Vache	France	20min	50%	30-32°C	50%	30°C	15min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-hard	Samso	Vache	Danemark	30-40min	30%	31°C	Jusqu'à 37°C	65°C	50min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Semi-hard	Svecia	Vache	Suède	30min	25%	30°C	20%	Chaude	25min	Dilution du lactosérum	Eugster-Meier et al. 2018
Semi-hard	Tilsit	Vache	Suisse				30%		20min	Dilution du lactosérum	Fröhlich-Wyder et al. 2015
Hard	Cheddar	Vache	Etats-Unis	10min	16%, 21,6% or 33%	38°C	16%, 21,6% or 33%	38°C	Jusqu'à pH 6,15	Dilution du lactosérum	Hou et al. 2012
Hard	Cheddar	Vache	Etats-Unis	10min	28,80%	34°C	28,80%	35°C	Jusqu'à pH 6,3	Dilution du lactosérum	Hou et al. 2014b
Hard	Cheddar	Vache	Etats-Unis		40%	40°C	25%	40°C		Dilution du lactosérum	Shakeel-Ur-Rehman et al. 2004
Hard	Cheddar	Vache	Etats-Unis	30min	50%	37°C	50%		1h	Dilution du lactosérum	Upreti et al. 2006
Hard	Cheddar	Vache	Etats-Unis	1h	40%	39°C	40%			Dilution du lactosérum	Huffman et al. 1984
Hard	Cheddar (Faible %MG)	Vache	Etats-Unis		100%	38°C	70% du poids du caillé	22°C	20 min	Rinçage du caillé	Johnson et Chen 1995
Hard	Cheddar (Faible %MG)	Vache	Etats-Unis		75%	36°C	75%	35°C		Dilution du lactosérum	Anderson et al. 1993
Hard	Cheddar (type "Suisse")	Vache	Suisse	10min	30%	45°C	30%	53°C		Dilution du lactosérum	Sheehan et al. 2008
Hard	Cheddar (type "Suisse")	Vache	Suisse		33%		33%	53°C	Jusqu'à 6,15 (10min)	Dilution du lactosérum	Lawlor et al. 2003
Hard	Emmental	Vache	Suisse	10min	30%	32°C	30%	53°C	Jusqu'à 6,15-6,30	Dilution du lactosérum	Araujo Mino 2012
Hard	Emmental	Vache	Suisse		0%		10% or 20%	40°C		Dilution du lactosérum	Jaros et al. 1997
Hard	Emmentaler	Vache	Suisse	30-60min		32°C	10-20%	52-54°C		Dilution du lactosérum	Hartmann et al. 2018
Hard	Graviera Kritis	Brebis ou mélange chèvre/brebis	Grèce	30min	10%	52°C	10%	52°C	15min	Dilution du lactosérum	Moatsou et al. 2004
Hard	Mihaliç	Vache, brebis, chèvre (seuls ou mélange)	Turquie			35°C		warm	10-15min	Dilution du lactosérum	Bintsis et al. 2018
Very hard	Sbrinz	Vache	Suisse	95min		57°C	4%	froide (baisser la température de 2°C)	30-35min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
Pasta filata	Mozzarella	Vache	Italie	25min	10%, 25% or 50%	40°C	10%, 25% or 50%	40°C	Jusqu'à pH 5,3-5,2 (10 min)	Dilution du lactosérum	Osaili et al. 2010
Pasta filata	Ragusano	Vache	Italie				8-10%	80°C	Jusqu'à 40-42°C	Dilution du lactosérum	Licitra et al. 2018
Pasta filata	Vastedda della Valle del Belice	Brebis	Italie	ajout d'eau pendant décaillage				Chaude	5 min	Dilution du lactosérum	Licitra et al. 2018
	Carrick		Royaume Uni	5-10min	40%	31°C	40%	33-36°C	50-60min	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998
	Reading Yellow		Royaume Uni	Brasser jusqu'à obtenir un caillé flottant librement	25% 25%	39,5°C	25% 25%	52°C 43°C	15min Soutirage "lorsque le caillé est ferme"	Dilution du lactosérum	Scott et al. 1998

OTW-S = One-time wash Symétrique

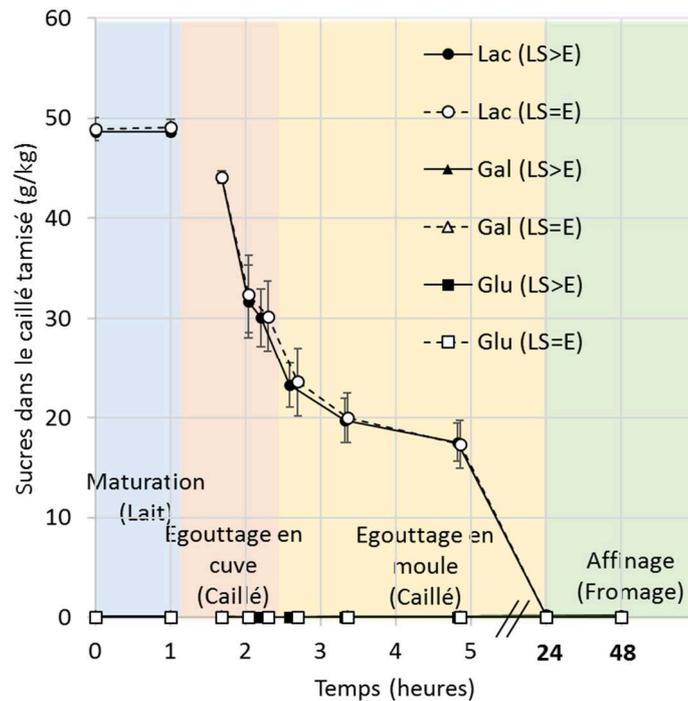
OTW-A = One-time wash Asymétrique

Annexes

Annexe 2 : Évolution de l'ESD en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

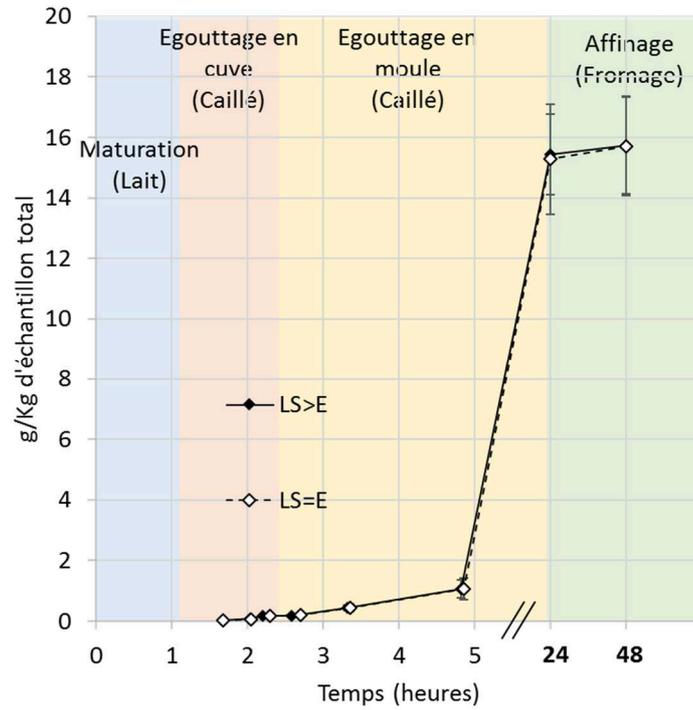


Annexe 3 : Évolution de la concentration en lactose, glucose et galactose en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

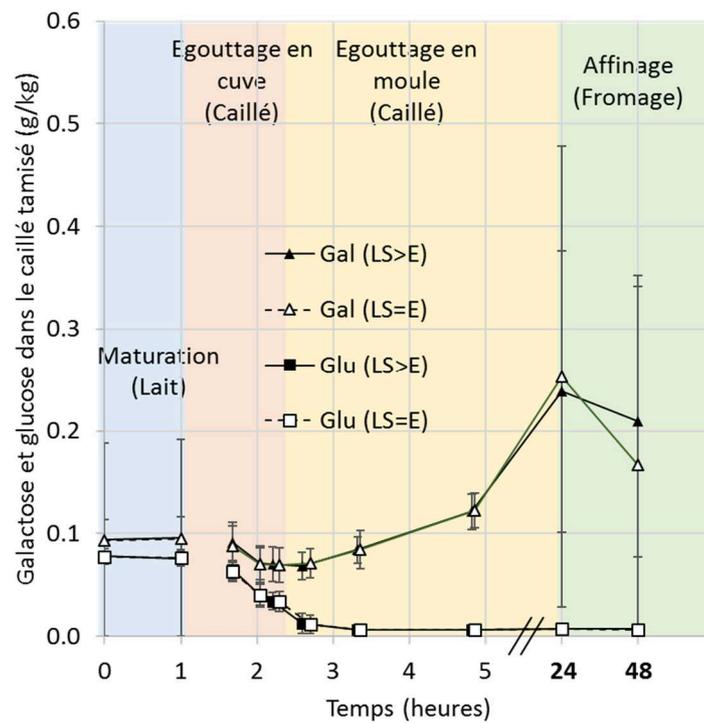


Annexes

Annexe 4 : Évolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

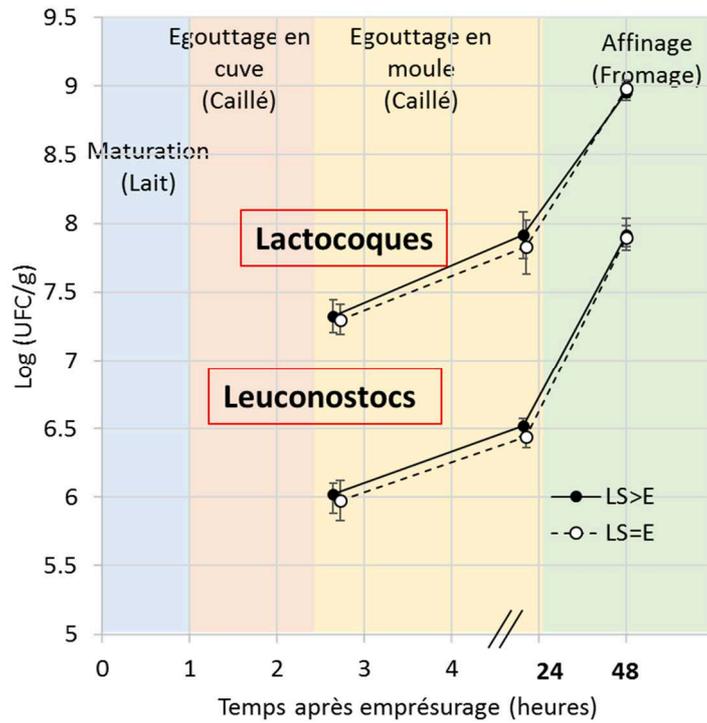


Annexe 5 : Évolution de la concentration en glucose et galactose en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

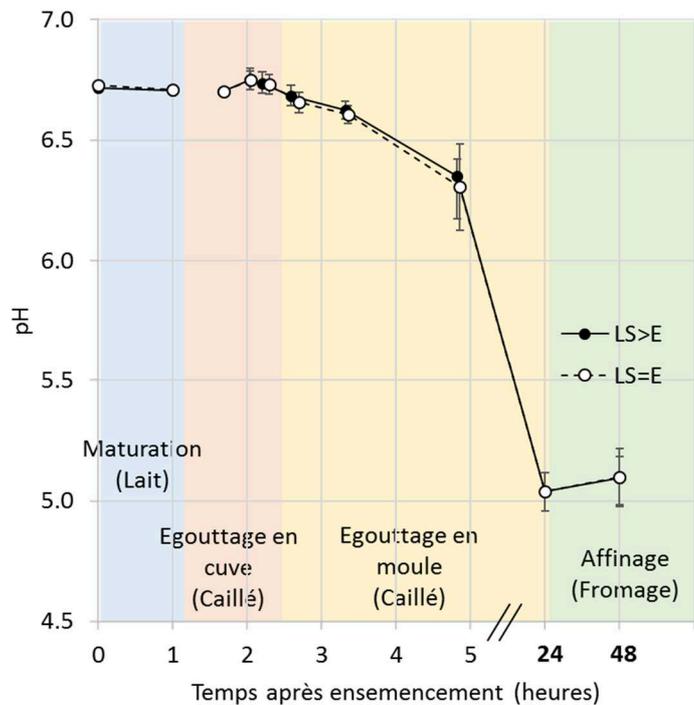


Annexes

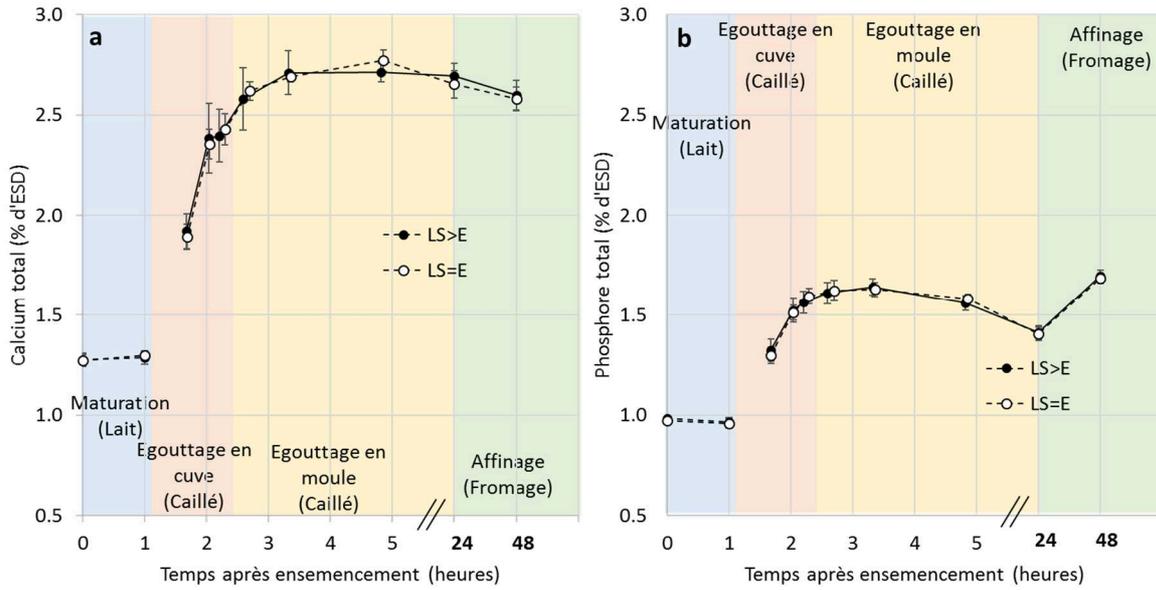
Annexe 6 : Évolution des niveaux de populations des Lactocoques et Leuconostocs en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.



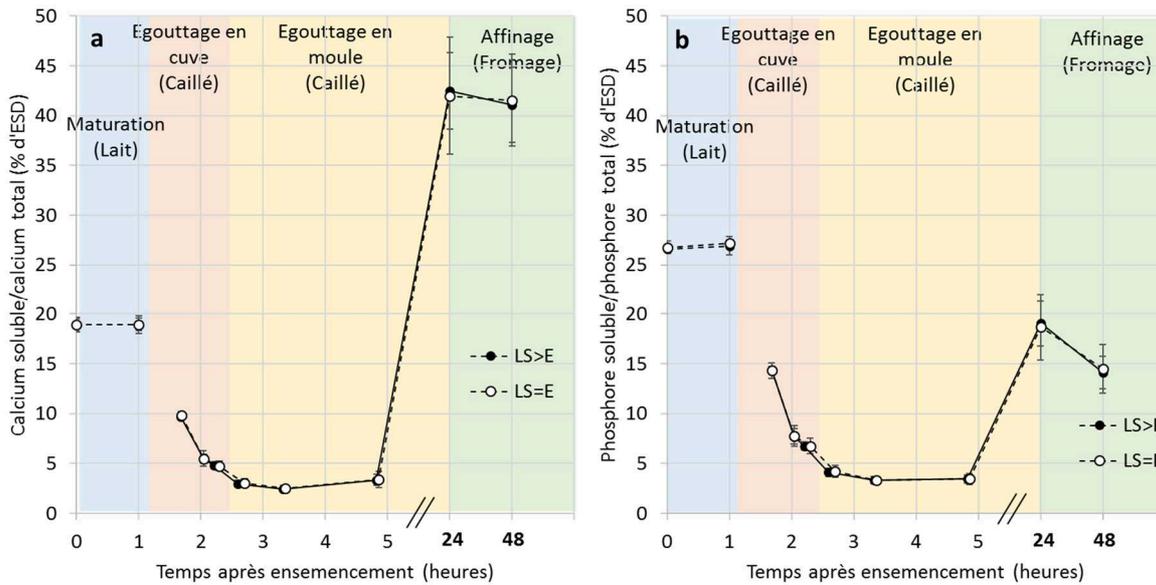
Annexe 7 : Évolution du pH en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.



Annexe 8 : Évolution de teneur en calcium total (a) et du phosphore total (b) sur l'ESD en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

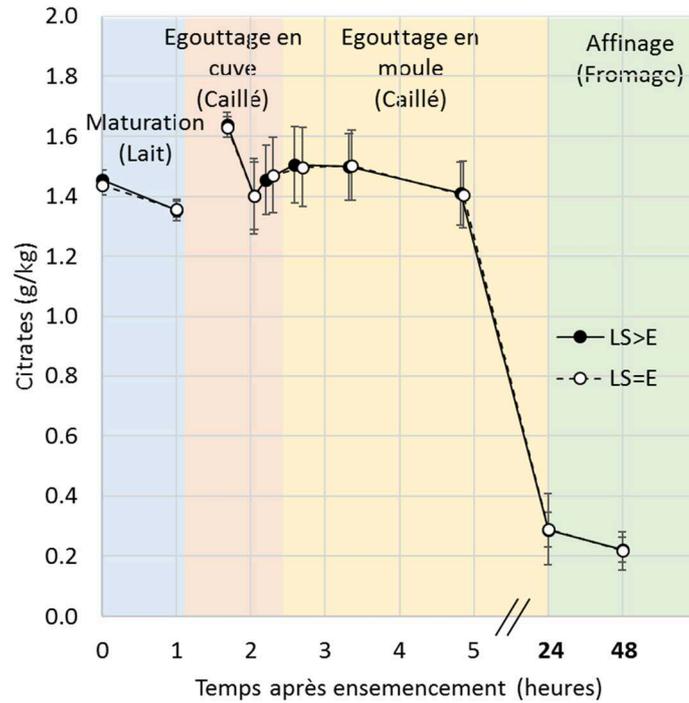


Annexe 9 : Évolution du ratio Ca soluble /Ca total (a) et du ratio P soluble/P total (b) en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.

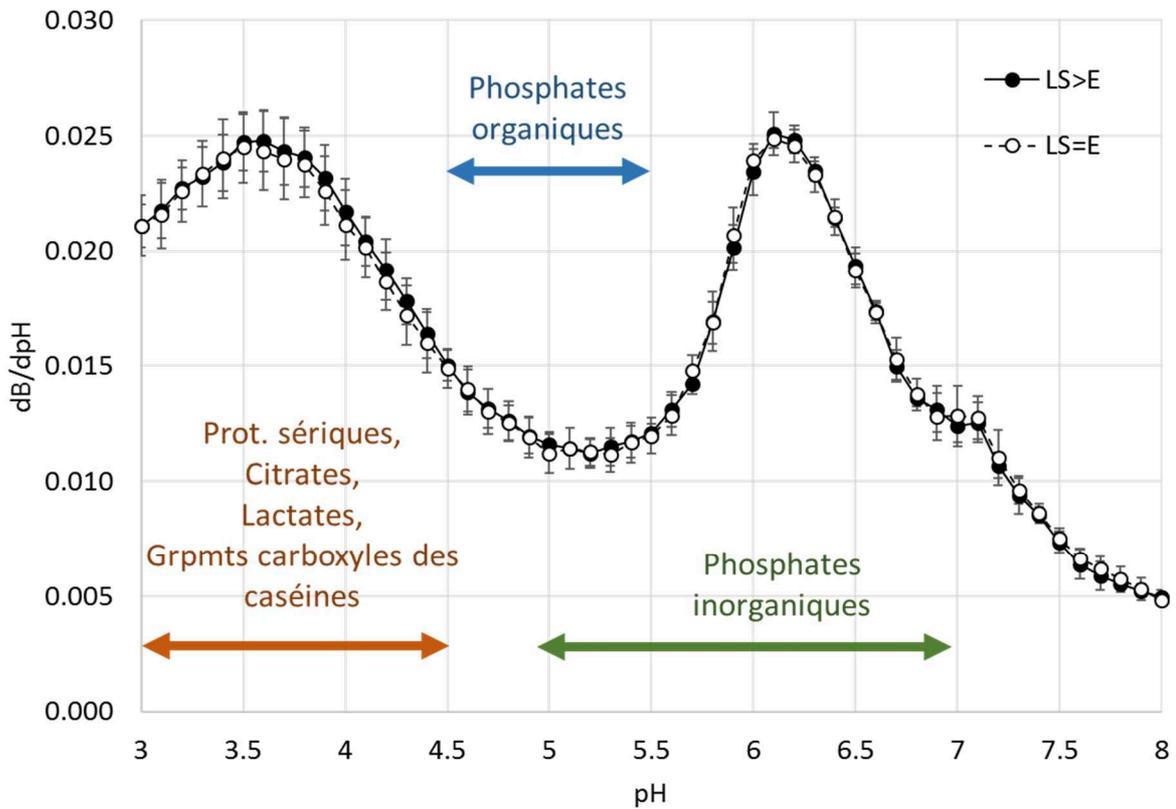


Annexes

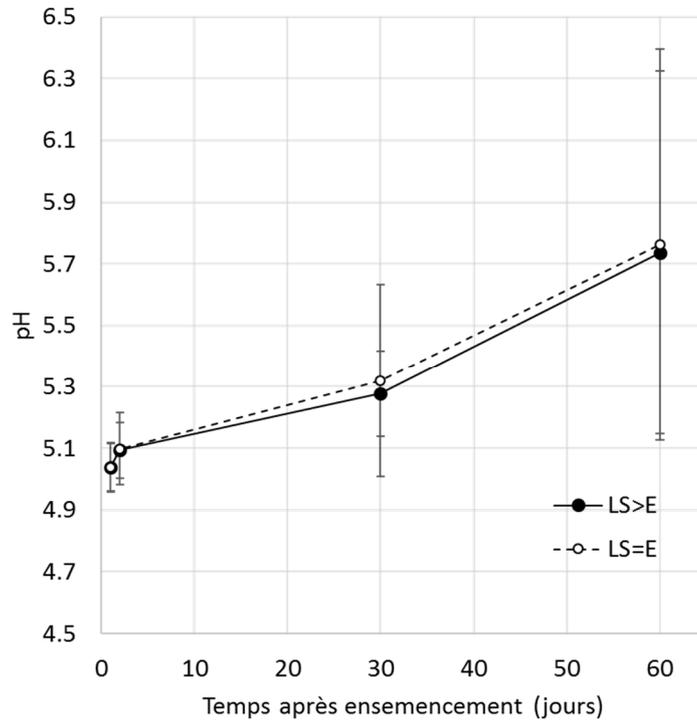
Annexe 10 : Évolution de la concentration en citrates en fonction du temps au cours de la fabrication selon le mode de dé lactosage.



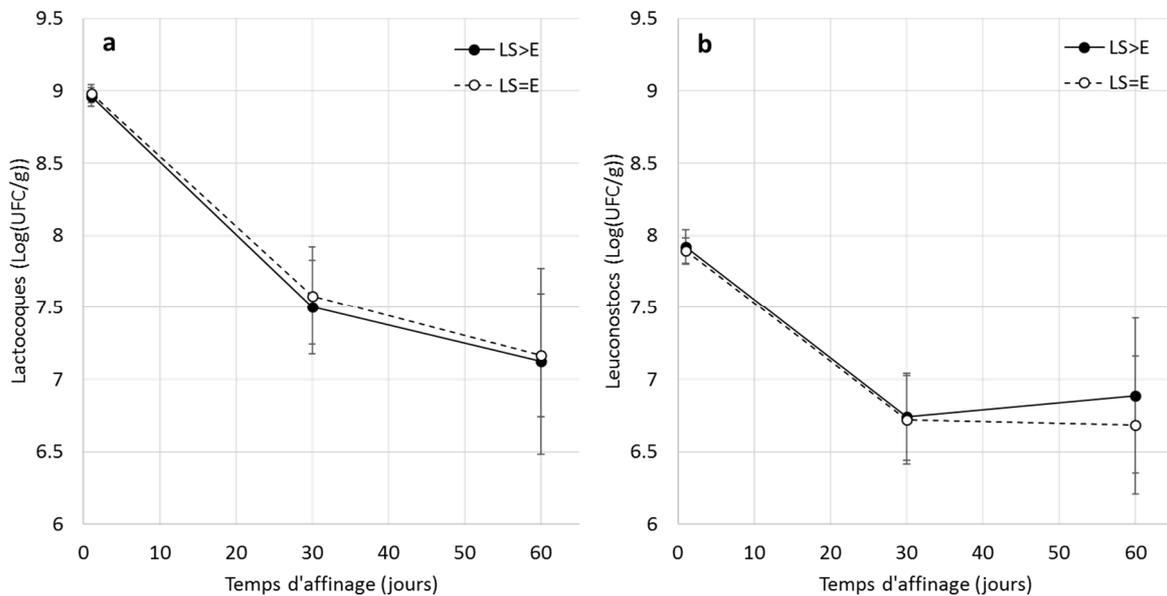
Annexe 11 : Indice de pouvoir tampon (dB/dpH) en fonction du pH au cours de la titration avec NaOH au dé moulage selon le mode de dé lactosage.



Annexe 12 : Évolution du pH en fonction du temps au cours de l'affinage selon le mode de dé lactosage.

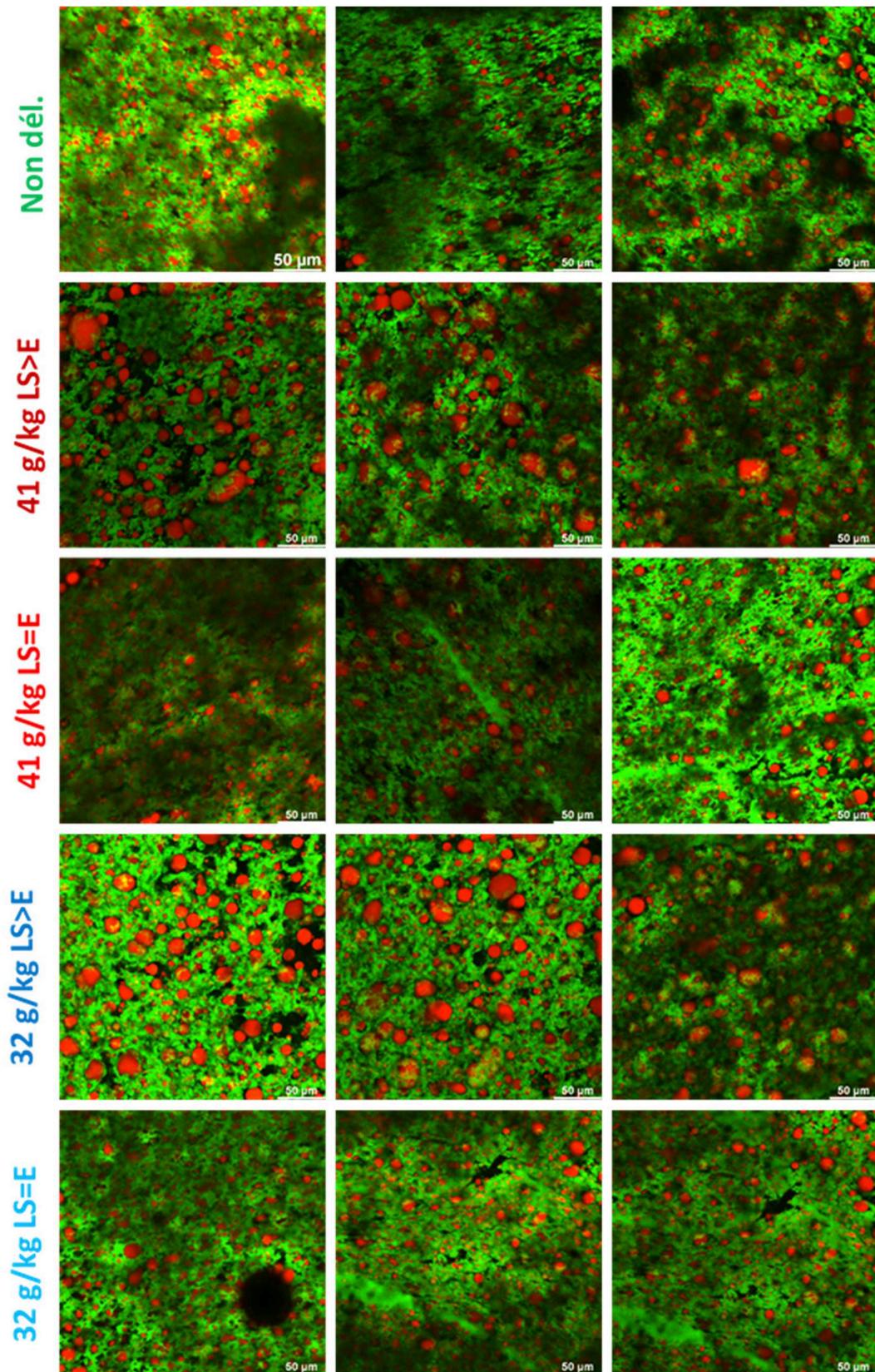


Annexe 13 : Évolution des populations de Lactocoques (a) et Leuconostocs (b) en fonction du temps au cours de l'affinage selon le mode de dé lactosage.



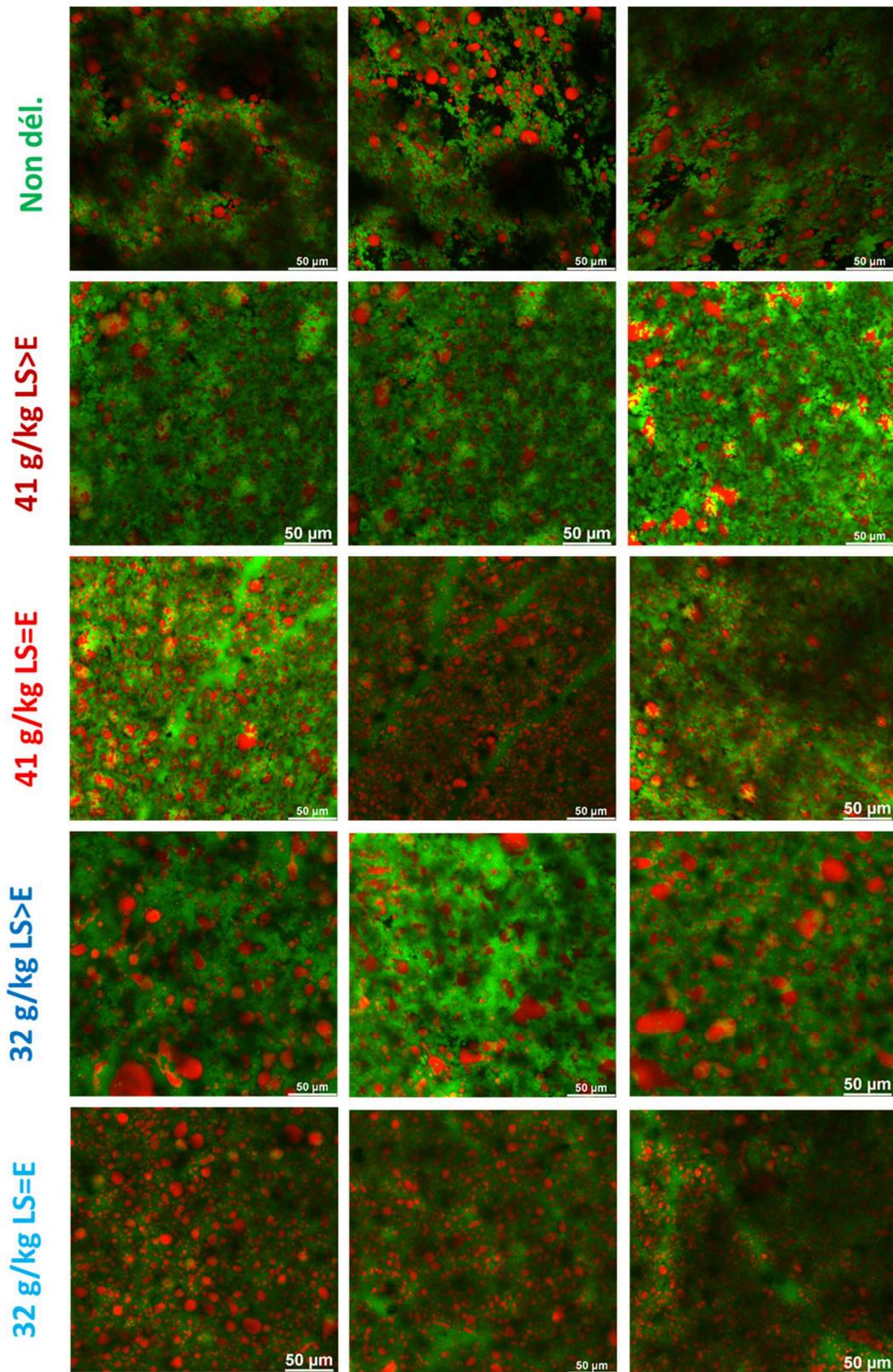
Annexes

Annexe 14 : Microstructure des fromages à J+5 par microscopie confocale (vert = protéines, rouge = MG)



Annexes

Annexe 15 : Microstructure des fromages en fin d'affinage par microscopie confocale (vert = protéines, rouge = MG)



Annexe 16 : *“A strategy to assess the sieving time of curd sampled during cheese manufacture to separate curd from whey”* accepté dans la revue *International Journal of Dairy Technology*.

SHORT
COMMUNICATION

A strategy to assess the sieving time of curd sampled during cheese manufacture to separate curd from whey

ÉMILIE DELORME,^{1,2}  BENOÎT PAYSANT,¹ PHILIPPE TROSSAT,¹ YVES GAÛZÈRE,³ SYLVIE POCHET,² ÉRIC BEUVIER² and CHRISTINE ACHILLEOS^{2*}

¹ACTALIA Pôle Expertise Analytique, ²INRAE, URTAL, and ³ISBA Franche-Comté, ENILBio, Poligny 39800, France

Sampling from the vat during cheesemaking may be necessary to study the impact of curd washing, which affects both whey composition and the curd's aqueous phase. The objective of this work was to develop a sieving protocol of curd–whey samples, ensuring enough time for drainage of the free whey, while limiting the loss of the aqueous phase entrapped in the curd grains. We studied the flow rate and lactose content of whey during sieving. Both measurements showed a two-stage dynamic representation of both aqueous phases, the intersection indicating the transition point between the flow of free and entrapped whey.

Keywords Cheese, Grains of curd, Sampling, Sieving, Syneresis, Whey.

Milk coagulation leads to the formation of a coagulum, a transient gel network trapping the aqueous phase of milk. Most of this aqueous phase is released at cutting, whereas the other part remains trapped in the resulting grains of curd. During cheesemaking, this trapped aqueous phase is expelled from the curd grains as a result of syneresis. Both aqueous phases are whey, but previous studies have shown differences in composition between them, particularly in lactose content (Czulak *et al.* 1969; Huffman 1985), and they can be distinguished as extra- and intra-granular aqueous phases (Mietton *et al.* 2004). Thus, an attention should be paid to the separation of curd and whey sampled from the vat for accurate compositional analysis of curd. Sieving is the method described in the literature for physical separation of curd from whey (Hou *et al.* 2012; Fagan *et al.* 2017; Aldalur *et al.* 2019; Panthi *et al.* 2019). The type of the sieve is detailed, but no authors have studied the sieving time to preserve the curd and its aqueous phase. However, the sieving time affects the moisture content of the curd sample and therefore its solute concentrations. This is of particular interest when manufacturing steps are likely to enhance differences in composition between both aqueous phases such as curd washing. Thereby, the curd with its aqueous

phase must be separated from the extra-granular aqueous phase in order to characterise the curd solute composition at the time of sampling. Therefore, our objective was to determine a sieving time enabling the elimination of a maximum of the extra-granular aqueous phase while retaining a maximum of the intra-granular aqueous phase.

Considering that the free extra-granular aqueous phase flows faster than the intra-granular aqueous phase, which is retained in the curd, two approaches were investigated in order to assess the transition point between extra-granular aqueous phase and intra-granular aqueous phase during sieving. These were the dynamics of flow rates and the lactose content of the flowing whey.

These investigations were carried out during the manufacture of semihard cheeses in the pilot plant of ISBA Franche-Comté (ENILBio, Poligny, FR) from a standardised local cow's milk (3.7% protein; 3.7% fat) pasteurised at 76 °C for 60 s. Milk (300 L) was directly inoculated at 31 °C with 23 g of freeze-dried CHN-11 starter (Chr. Hansen, DK) and left to mature for 60 min. Then, recombinant chymosin (200 IMCU/mL) (CHY-MAX[®] Plus, Chr. Hansen, DK) was added to the vat (30 mL/100 L), and coagulation was developed for 25 min. The

*Author for correspondence. E-mail: christine.achilleos@inrae.fr

© 2021 Society of Dairy Technology

coagulum was cut into particles (0.6 cm), and the curd–whey mixture was stirred for 10 min at 31 °C. Curd washing was performed by the addition of 117 L of water at 32 °C for 5 min. The curd–whey mixture was heated to 35 °C for 5 min, followed by a final stirring (35 °C, 20 min) until the whey was drained.

Curd–whey samples were collected from the stirred vat with a pitcher and immediately poured over a cheese mould cloth (Kadova® Saint-Paulin 1.8 kg), which was used as a sieve, and held over a bucket to retrieve the flowing whey (Figure 1).

To study the flow rate of whey during sieving, the curd–whey mixture was sampled (1 L) 1 min before curd washing and poured into the sieve. Four samples were analysed from four different vats. The weight of the whey flowing from the sieved curd was measured every 10 s for 300 s from the moment the sample started to be poured into the sieve (0 s). Calculation of the whey flow rate began when all the curd was in the sieve at 10 s. The first flow rate value, representing the amount of whey that flows between 10 and 20 s of sieving, is the point at 20 s. Dry matter content of the sieved curd was determined according to IDF (2004) standard at 0 s, 30 s, 60 s and 300 s of sieving ($n = 3$).

To study the evolution of the lactose content in the flowing whey, the curd–whey mixture was sampled 30 s after the end of curd washing and poured into the sieve. At this moment, the difference in lactose content between the diluted extra-granular aqueous phase and the less diluted intra-granular aqueous phase is maximised and the identification of the two phases becomes easier. To perform this experiment under similar conditions to the study of the flow rate, the sampling volume was adjusted (2 L) in order to sieve the same curd weight. Two samples were analysed from two different vats. Ten millilitres of the flowing whey

were collected under the sieve between 0 s and 260 s for lactose content determination. Lactose content was analysed in whey samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) using a Thermo Scientific Dionex ICS-3000 system. An internal standard was added to the sample, which was then freed from proteins and fats and diluted before injection. Lactose was separated from the other sugars using a CarboPac PA-1 column fitted with a CarboPac PA-1 guard column (250 and 50 mm × 2 mm, respectively) and a sodium hydroxide/sodium acetate gradient. Quantification was performed by referring to a calibration curve and conforming to an internal standard procedure. Samples were prepared and analysed in duplicate.

Flow rate and lactose content dynamics were modelled using linear regression (XLSTAT software version 2019.4.2; Paris, FR). Changes in the dynamics over time were estimated by the intersection of the models.

The flow rates showed a two-stage decrease: at first, a rapid decrease between 20 and 60 s, and then a gradual decrease until 300 s (Figure 2). This is in agreement with the evolution of the curd dry matter during sieving. It showed a rapid increase during the first 60 s (from 16% to 20%), suggesting the loss of a great amount of aqueous phase, probably mainly extra-granular. And then, this increase slowed down until 300 s, suggesting a more progressive draining (Figure 3). These results showed the importance of determining a suitable sieving time because changes in dry matter content of the curd due to an approximate sieving time are likely to impact its solute content. The first 60 s may indicate the loss of whey barely retained by the curd, consisting mainly of extra-granular aqueous phase and a small amount of intra-granular aqueous phase. From about 100 s, we considered that most of the extra-

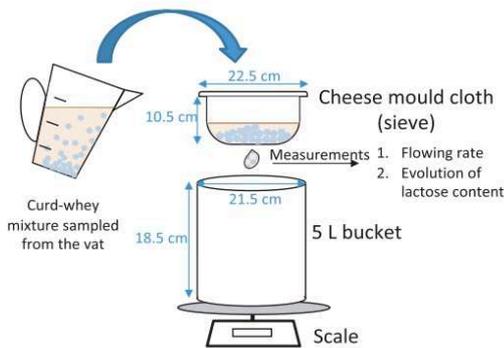


Figure 1 Device used to sieve the curd–whey mixture.

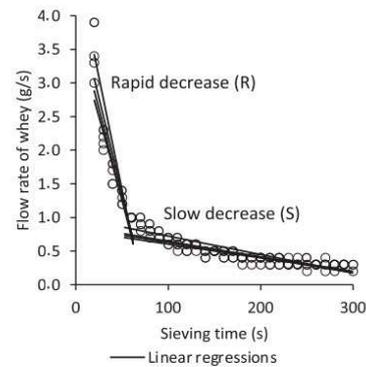


Figure 2 Flow rates (○) of the aqueous phases during the sieving of curd samples ($n = 4$) and linear regressions modelling the two-stage dynamics.

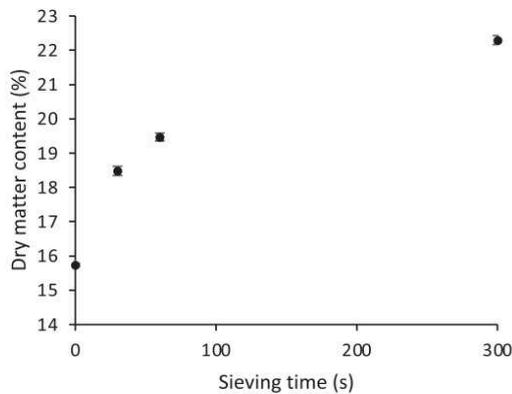


Figure 3 Evolution of the dry matter content of the curd after 0 s, 30 s, 60 s and 300 s of sieving ($n = 3$).

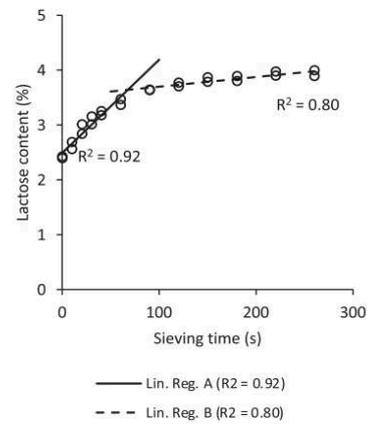


Figure 4 Lactose content (O) evolution in the aqueous phases during the sieving of a curd/whey mixture and the modelling of these dynamics (intersection: 67.4 s).

Table 1 Coefficient of determination, significance, and intersection points on the time axis of the linear models for the two stages (R = rapid decrease, S = slow decrease) during curd sample sieving.

Sample	Stage	R^2	P -value ^a	Intersection (s)
1	R	0.91	0.010	61.4
	S	0.77	<0.001	
2	R	0.86	0.023	60.7
	S	0.77	<0.001	
3	R	0.92	0.011	60.7
	S	0.84	<0.001	
4	R	0.89	0.017	58.6
	S	0.85	<0.001	
Mean (s)				60.4
Variation (%) ^b				2.01

^aSignificant when $P < 0.05$.

^bVariation (%) = $\frac{\sigma}{\mu} \times 100$.

granular aqueous phase was drained and that the flowing whey would be mainly composed of intra-granular aqueous phase, slowly exuded from the curd. The rapid decrease (R) and slow decrease (S) speeds were modelled for each of the 4 sieved curd samples (Figure 2). The model intersection time could be considered as the moment when most of the extra-granular aqueous phase has drained, while most of the intra-granular aqueous phase remains in the curd. The average intersection time was estimated at 60 s, with 2% variation (Table 1).

The lactose content of the whey drained from the sieve showed a two-stage increase: at first a rapid rise from 2.4% to 3.4% during the first 60 s, and then a slower increase from 3.6% to 4.0% between 90 and 260 s (Figure 4). The

difference in lactose content between the beginning and the end of sieving confirms the presence of two different aqueous phases: diluted extra-granular aqueous phase and less diluted intra-granular aqueous phase. The increase in lactose content in the first 60 s reflects an increase in the proportion of intra-granular aqueous phase in the stream as the extra-granular aqueous phase drained out. Then, the stabilisation of the lactose content from 90 s indicated that the outflow of whey was composed of intra-granular aqueous phase. The intersection of the two linear models of lactose content, both rapid increase and slow increase, indicates a transition around 67 s (Figure 4).

This study showed that it was possible to discriminate between extra- and intra-granular aqueous phases and to remove a maximum of extra-granular aqueous phase while retaining a maximum of intra-granular aqueous phase. Measurements of flow rate and lactose content of the sieved whey allowed the assessment of the transition point between the extra- and intra-granular aqueous phases. The quick evolution of the dry matter content during sieving confirmed the impact of the sieving time on the moisture content of the curd and therefore the need to determine a relevant sieving time for the analysis of the curd solute composition. Under the conditions of our experiment, this point could be set between 60 and 67 s. The whey flowing out the sieve after this time can be considered as intra-granular aqueous phase.

The sieving time will be related not only to the type of sieve but also to the manufacturing process applied like the composition of milk, the type of coagulation, the temperature, and the pH, which impacts curd properties and syneresis (Panthi *et al.* 2019).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the French Dairy Inter-branch Organization (CNIEL, Paris, FR). The authors thank Fabrice Buchin for cheese manufacturing (ISBA Franche-Comté, ENILBio, Poligny, FR) and Fabrice Petitpas and Pascal Barbet for technical help (INRAE, URTAL, Poligny, FR).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Émilien Delorme: Writing-original draft; writing-review & editing. **Benoît Paysant**: Visualization; writing-review & editing. **Philippe Trossat**: Methodology; supervision, validation; visualization. **Yves Gaüzère**: Validation. **Sylvie Pochet**: Methodology; validation; visualization. **Éric Beuvier**: Supervision; validation; writing-review & editing. **Christine Achilleos**: Supervision; validation; visualization; writing-review & editing.

REFERENCES

- Aldalur A, Ong L, Bustamante M Á, Gras S L and Barron L J R (2019) Impact of processing conditions on microstructure, texture and chemical properties of model cheese from sheep milk. *Food and Bioprocesses Processing* **116** 160–169.
- Czulak J, Conochie J, Sutherland B J and Van Leeuwen H J M (1969) Lactose, lactic acid and mineral equilibria in Cheddar cheese manufacture. *Journal of Dairy Research* **36** 93–101.
- Fagan C C, O'Callaghan D J, Mateo M J and Dejmek P (2017) The syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology: General Aspects*, 4th edn, Vol. 1, pp. 145–179. Fox P F, McSweeney P L H, Cogan T M and Guinee T P, eds. Boston, MA: Elsevier.
- Hou J, Hannon J A, McSweeney P L H, Beresford T P and Guinee T P (2012) Effect of curd washing on composition, lactose metabolism, pH, and the growth of non-starter lactic acid bacteria in full-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* **25** 21–28.
- Huffman L M (1985) *Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening*. PhD Thesis. The Ohio State University.
- IDF Standard 4 / ISO 5534 (2004) Cheese and processed cheese - Determination of the Total Solids Content. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Mietton B, Gaucheron F and Salatin F (2004) *Minéraux et transformations fromagères. Minéraux et produits laitiers*, pp. 472–563. Tec&Doc.
- Panthi R R, Kelly A L, O'Callaghan D J and Sheehan J J (2019) Measurement of syneretic properties of rennet-induced curds and impact of factors such as concentration of milk: A review. *Trends in Food Science & Technology* **91** 530–540.

Références

bibliographiques

- Achilleos, C., Berthier, F., 2013. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiology* 36, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.024>
- Aimar, P., Daufin, G., 2004. Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire. *Techniques de l'Ingénieur* F3250.
- Ali, A.E., Andrews, A.T., Cheeseman, G.C., 1980. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. *Journal of Dairy Research* 47, 371–382.
- Almena-Aliste, M., Mietton, B., 2014. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective, in: *Cheese and Microbes*. American Society of Microbiology Microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp. 39-71.
- Ardö, Y., Mc Sweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F., 2017. Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis, in: *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Volume 1: General Aspects. Elsevier, Boston MA, pp. 445–483.
- Benthin, S., Nielsen, J., Villadsen, J., 1994. Galactose Expulsion during Lactose Metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 Due to Dephosphorylation of Intracellular Galactose 6-Phosphate. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1254–1259. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.4.1254-1259.1994>
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Bogenrief, D.D., Olson, N.F., 1995. Hydrolysis of beta-casein increases Cheddar cheese meltability. *Milchwissenschaft* 50, 678–682.
- Bush, C.S., Caroutte, C.A., Amundson, C.H., Olson, N.F., 1983. Manufacture of Colby and Brick cheeses from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* 66, 415–421.
- Cataldi, T.R.I., Angelotti, M., Bianco, G., 2003. Determination of mono- and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytica Chimica Acta* 485, 43–49.
- Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, 2019. L'économie laitière en

chiffres.

- Chen, A.H., Larkin, J.W., Clark, C.J., Irwin, W.E., 1979. Textural Analysis of Cheese. *Journal of Dairy Science* 62, 901–907.
- CNERMA, 1986. Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de Clostridia. *Revue Laitière Française* 3945.
- Creamer, L.K., Lawrence, R.C., Gilles, J., 1985. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand journal of dairy science and technology* 185–203.
- Creamer, L.K., Olson, N.F., 1982. Rheological Evaluation of Maturing Cheddar Cheese. *Journal of Food Science* 47, 631–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10138.x>
- Dalgleish, D.G., Corredig, M., 2012. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 3, 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Delacroix-Buchet, A., Trossat, P., 1991. Protéolyse et texture des fromages à pâte pressée cuite. I. Influence de l'activité de l'eau. *Lait* 71, 299–311. <https://doi.org/10.1051/lait:1991322>
- Eugster-Meier, E., Fröhlich-Wyder, M.-T., Jakob, E., Wechsler, D., Belén Lopez Morales, M., Licitra, G., Berthier, F., Papademas, P., Ardö, Y., Tavares, T.G., Malcata, F.X., Radulovic, Z., Miocinovic, J., 2018. Semi-hard cheeses, in: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. Wiley-Blackwell, Cyprus, pp. 247–293.
- Fagan, C.C., O'Callaghan, D.J., Mateo, M.J., Dejmek, P., 2017. The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd, in: *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Volume 1: General Aspects. Elsevier, Boston MA, pp. 145–179.
- Farkye, N.Y., Fox, P.F., 1990. Observations on plasmin activity in cheese. *Journal of Dairy Research* 57, 413–418. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027060>
- Fox, P.F., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2017. Factors That Affect the Quality of Cheese, in: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Boston MA, pp. 617–640.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., 2013. Cheese Science and Technology, in: *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 368–369.
- Gagnaire, V., Trotel, E., Graët, Y.L., Léonil, J., 2002. Role of electrostatic interactions in the curd of Emmental cheese. *International Dairy Journal* 12, 601–608. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00052-3)
- Gandhi, N.N., Cobra, P.F., Steele, J.L., Markley, J.L., Rankin, S.A., 2018. *Lactobacillus* demonstrate thiol-independent metabolism of methylglyoxal: Implications toward

- browning prevention in Parmesan cheese. *Journal of Dairy Science* 101, 968–978. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13577>
- Gaucheron, F., 2005. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development* 45, 473–483.
- Goudéranche, H., Camier-Caudron, B., Gassi, J.-Y., Schuck, P., 2001. Procédés de transformation fromagère (partie 3). *Techniques de l'Ingénieur* F6307.
- Green, M.L., Glover, F.A., Scurlock, E.M.W., Marshall, R.J., Hatfield, D.S., 1981. Effect of use of milk concentrated by ultrafiltration on the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 48, 333.
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, in: *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Volume 1: General Aspects. Elsevier, Boston MA, pp. 317–378.
- Hartmann, K., Eugster-Meier, E., Fröhlich-Wyder, M.-T., Jakob, E., Wechsler, D., Ardö, Y., Düsterhöft, E.-M., Engels, W., Huppertz, T., Hynes, E.R., Perotti, M.C., Bergamini, C.V., 2018. Swiss-Type Cheeses (Propionic Acid Cheeses), in: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. Wiley-Blackwell, Cyprus, pp. 336–346.
- Hassan, A., Johnson, M.E., Lucey, J.A., 2004. Changes in the proportions of soluble and insoluble calcium during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 87, 854–862.
- Hou, J., Hannon, J.A., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P., Guinee, T.P., 2014. Effect of curd washing on cheese proteolysis, texture, volatile compounds, and sensory grading in full fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 34, 190–198.
- Hou, J., Hannon, J.A., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P., Guinee, T.P., 2012. Effect of curd washing on composition, lactose metabolism, pH, and the growth of non-starter lactic acid bacteria in full-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 25, 21–28.
- Huffman, L.M., 1985. Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening (PhD Thesis). The Ohio State University.
- Hurley, M.J., Larsen, L.B., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal* 10, 673–681.
- Hurley, M.J., O'Driscoll, B.M., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H., 1999. Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. *International Dairy Journal* 9, 553–558.
- Hutkins, R.W., Nannen, N.L., 1993. pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 76, 2354–2365.
- Ibáñez, R.A., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Johnson, M.E., McSweeney, P.L.H., Lucey, J.A.,

2020. Low- and reduced-fat milled curd, direct-salted Gouda cheese: Comparison of lactose standardization of cheesemilk and whey dilution techniques. *Journal of Dairy Science* 103, 488-492.
- Iskandar, C.F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.-M., 2019. Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science & Technology* 88, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020>
- ISO 707, 2008. *Milk and milk products - Guidance on sampling*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 5534, 2004. *Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method)*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 6731, 2011. *Milk, cream and evaporated milk - Determination of total solids content (Reference method)*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 7208, 2008. *Skimmed milk, whey and buttermilk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 8070, 2007. *Milk and milk products - Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents - Atomic absorption spectrometric method*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 8586, 2012. *Analyse sensorielle — Lignes directrices générales pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des sujets qualifiés et sujets sensoriels experts*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- ISO 8589, 2010. *Analyse sensorielle - Directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- ISO 8968-4, 2001. *Milk - Determination of nitrogen content - Part 4: Determination of non-protein-nitrogen content*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 17997-1, 2004. *Milk - Determination of casein-nitrogen content - Part 1: Indirect method (Reference method)*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 18787, 2017. *Foodstuffs - Determination of water activity*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- ISO 19662, 2018. *Milk - Determination of fat content - Acido-butyrometric (Gerber method)*. International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.
- ISO 27871, 2011. *Cheese and processed cheese - Determination of the nitrogenous fractions*.

International Dairy Federation (IDF), Schaerbeek, Belgium.

Isolini, D., Grand, M., Glättla, H., 1990. Selective media for the detection of obligate and facultative heterofermentative lactobacilli. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 19, 57–59.

Jaros, D., Ginzinger, W., Tschager, E., Mayer, H.K., Rohm, H., 1997. Effects of water addition on composition and fracture properties of Emmental cheese. *Lait* 77, 467–477.

Johnson, M.E., Chen, C.M., 1995. Technology of Manufacturing Reduced-Fat Cheddar Cheese, in: Malin, E.L., Tunick, M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. Springer US, Boston, MA, pp. 331–337.

Johnson, M.E., Steele, J.L., Broadbent, J., Weimer, B.C., 1998. Manufacture of Gouda and flavour development in reduced-fat cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 53, 67–69.

Kilcawley, K., O’Sullivan, M., 2018. Cheese flavour Development and Sensory Characteristics, in: *Global Cheesemaking Technology*. Wiley-Blackwell, Cyprus, pp. 45–70.

Klantschitsch, T., Bachmann, H.-P., Puhan, Z., 2000. Influence of milk treatment and ripening conditions on quality of Raclette cheese. *Lait* 80, 51–67.

Lacou, L., Lê, S., Pezennec, S., Gagnaire, V., 2015. An *in silico* approach to highlight relationships between a techno-functional property of a dairy matrix and a peptide profile. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 475, 44–54.

Lacou, L., Léonil, J., Gagnaire, V., 2016. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocolloids* 57, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.028>

Lamichhane, P., Kelly, A.L., Sheehan, J.J., 2018. Symposium review: Structure-function relationships in cheese. *Journal of Dairy Science* 101, 2692–2709.

Lamichhane, P., Sharma, P., Kennedy, D., Kelly, A.L., Sheehan, J.J., 2019. Microstructure and fracture properties of semi-hard cheese: Differentiating the effects of primary proteolysis and calcium solubilization. *Food Research International* 125, 1–10.

Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J., 1987. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748–1760.

Lee, Johnson, M.E., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Lucey, J.A., 2011. Effect of different curd-washing methods on the insoluble Ca content and rheological properties of Colby cheese during ripening. *Journal of Dairy Science* 94, 2692–2700.

Lee, M.-R., Johnson, M.E., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Lucey, J.A., 2010. Insoluble calcium content and rheological properties of Colby cheese during ripening. *Journal of*

Dairy Science 93, 1844–1853.

- Lee, M.-R., Johnson, M.E., Lucey, J.A., 2005. Impact of modifications in acid development on the insoluble calcium content and rheological properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 88, 3798–3809.
- Lenoir, J., Lambert, G., Schmidt, J.L., Tourneur, C., 1985. La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* 41, 23–50.
- Li, Y., Corredig, M., 2014. Calcium release from milk concentrated by ultrafiltration and diafiltration. *Journal of Dairy Science* 97, 5294–5302.
- Lolkema, H., 1994. Cheese yield used as an instrument for process control - Experience in Friesland, the Netherlands, in: *Factors Affecting the Yield of Cheese*, IDF Special Issue No. 9301. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, pp. 156–197.
- Lopez, C., Camier, B., Gassi, J.-Y., 2007. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal* 17, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.015>
- Lorient, D., Closs, B., Courthaudon, J.L., 1991. Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et dérivés. *Lait* 141–171.
- Lucey, J.A., 2002. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science* 85, 281–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Lucey, J.A., Gorry, C., Fox, P.F., 1993. Changes in the acid-base buffering curves during the ripening of Emmental cheese. *Milchwissenschaft* 48, 183–186.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E., Horne, D.S., 2003. Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science* 86, 2725–2743.
- Lucey, J.A., Mishra, R., Hassan, A., Johnson, M.E., 2005. Rheological and calcium equilibrium changes during the ripening of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 15, 645–653.
- Martley, F.G., Crow, V.L., 1996. Open texture in cheese: the contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *Journal of Dairy Research* 63, 489–507.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R., 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45, 655–656.
- McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127–144.

- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G., & Fox, P.F. (2017). *Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview* (4th ed., Vol. 1, pp. 781–800). Elsevier.
- Mietton, B., Gaucheron, F., Salaün, F., 2004. Minéraux et transformations fromagères, in: *Minéraux et Produits Laitiers*. Tec&Doc, pp. 472–563.
- Miranda, G., Bianchi, L., Krupova, Z., Trossat, P., Martin, P., 2020. An improved LC–MS method to profile molecular diversity and quantify the six main bovine milk proteins, including genetic and splicing variants as well as post-translationally modified isoforms. *Food Chemistry: X* 5. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100080>
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., Anifantakis, E., 2004. Effect of different manufacturing parameters on the characteristics of Graviera Kritis cheese. *International Journal of Dairy Technology* 57, 215–220.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177, 136-154.
- Moynihan, A.C., Govindasamy-Lucey, S., Molitor, M., Jaeggi, J.J., Johnson, M.E., McSweeney, P.L.H., Lucey, J.A., 2016. Effect of standardizing the lactose content of cheesemilk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 99, 7791–7802.
- NF V 04-287, 2017. *Cheese - Determination of fat content - Acido-butyrometric method*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- NF V 04-289, 1978. *Fromages et fromages fondus. Détermination de la teneur en chlorures. Méthode de routine*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- NF V 08-011, 1978. *Microbiologie alimentaire. Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes. Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 degrés C*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- NF V 08-054, 1999. *Microbiologie des aliments - Dénombrement des entérobactéries par comptage des colonies à 30 degrés Celsius - Méthode de routine*. Association Française de Normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France.
- Noel, Y., Lefier, D., 1991. Factors affecting the consistency of ripened soft & semi-soft cheese. *Bulletin of the IDF* 268, 44–48.
- Oberg, C.J., Wang, A., Moyes, L.V., Brown, R.J., Richardson, G.H., 1991. Effects of Proteolytic Activity of Thermolactic Cultures on Physical Properties of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science* 74, 389–397.
- O'Mahony, J.A., McSweeney, P.L.H., Lucey, J.A., 2006. A model system for studying the effects

- of colloidal calcium phosphate concentration on the rheological properties of Cheddar cheese. *Journal of dairy science* 89, 892–904.
- Oommen, B.S., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R., Strickland, M., 2002. Proteolytic Specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Influences Functional Properties of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science* 85, 2750–2758. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74362-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74362-2)
- O’Sullivan, M.M., Singh, H., Munro, P.A., Mulvihill, D.M., 2002. The effect of cooking and washing temperature during pilot-scale rennet casein manufacture on casein hydration characteristics in disodium orthophosphate solution. *International Journal of Dairy Technology* 55, 18–26.
- Pastorino, A.J., Hansen, C.L., McMahon, D.J., 2003. Effect of Salt on Structure-Function Relationships of Cheese. *Journal of Dairy Science* 86, 60–69.
- Reid, J.R., Coolbear, T., 1999. Specificity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 Proteinase, Lactocepin III, in Low-Water-Activity, High-Salt-Concentration Humectant Systems and Its Stability Compared with That of Lactocepin I. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2947–2953. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.2947-2953.1999>
- Richoux, R., Aubert, L., Roset, G., Kerjean, J.-R., 2009. Impact of the proteolysis due to lactobacilli on the stretchability of Swiss-type cheese. *Dairy Science and Technology* 89, 31–41.
- Roudot-Algaron, F., Kerhoas, L., 1994. Isolation of γ -Glutamyl Peptides from Comte Cheese. *Journal of Dairy Science* 5, 1161–1166.
- Sadat-Mekmene, L., Richoux, R., Aubert-Frogerais, L., Madec, M.-N., Corre, C., Piot, M., Jardin, J., le Feunteun, S., Lortal, S., Gagnaire, V., 2013. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. *Journal of Dairy Science* 96, 1455–1470.
- Salaün, F., 2005. Minéralisation et pouvoir tampon du lait et des caillés à PM et PPNC au démoulage (PhD Thesis). Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes.
- Salvat-Brunaud, D., Maubois, J.L., Le Graët, Y., Piot, M., Maillard, M.B., Corre, C., Thierry, A., 1995. Extraction et analyse de la phase aqueuse de l’emmental à 4 stades d’affinage. *Lait* 75, 239–249.
- Shakeel-Ur-Rehman, Waldron, D., Fox, P.F., 2004. Effect of modifying lactose concentration in cheese curd on proteolysis and in quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 14, 591–597.
- Sheehan, J.J., Oliveira, J.C., Kelly, A.L., Mc Sweeney, P.L.H., 2007. Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal* 17, 826–834.

- Snappe, J.-J., Lepoudere, A., Sredzinski, N., 2010. Protéines laitières. *Techniques de l'Ingénieur* 1(F4820).
- Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 327–345.
- Spanneberg, R., Salzwedel, G., Glomb, M.A., 2012. Formation of Early and Advanced Maillard Reaction Products Correlates to the Ripening of Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 600–607. <https://doi.org/10.1021/jf204079f>
- Tarodo De La Fuente, B., Lablée, J., 1993. Microstructure du coagulum laitier et technologie fromagère. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 66, 57–62.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29, 807–13.
- Thierry, A., Collins, Y.F., Abeijon Mukdsi, M.C., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., Spinnler, H.E., 2017. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese, in: *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Volume 1: General Aspects. Elsevier, Boston MA, pp. 423–443.
- Toelstede, S., Dunkel, A., Hofmann, T., 2009. A Series of Kokumi Peptides Impart the Long-Lasting Mouthfulness of Matured Gouda Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1440–1448.
- van den Berg, G., de Vries, E., 1975. Whey composition during the course of cheese manufacture, as affected by the amount of starter and curd washing water. *Netherland Milk Dairy Journal* 29, 181–197.
- Van Slyke, D.D., 1922. On the measurement of buffer values and on the relationship of buffer value to the dissociation constant and reaction of the buffer solution. *Journal of Biological Chemistry* 52, 525–570.
- Vélez, M.A., Bergamini, C.V., Ramonda, M.B., Candioti, M.C., Hynes, E.R., Perotti, M.C., 2015. Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT - Food Science and Technology* 64, 282–288.
- Vélez, M.A., Perotti, M.C., Candioti, M.C., Bergamini, C.V., Hynes, E.R., 2016. Plasmin and coagulant activities in a minicurd model system: Study of technological parameters. *Journal of Dairy Science* 99, 7053–7062.
- Verschueren, M., Van den Hoven, G.A., de Jong, P., 2002. Enhancement of curd washing efficiency: a two-stage extraction process. *Australian Journal of Dairy Technology* 57, 144.
- Visser, J., 1991. Factors Affecting the Rheological and Fracture Properties of Hard and Semi-hard Cheese. *Bulletin of the IDF* 268, 49–61.

- Walstra, P., van Vliet, T., 1982. Rheology of cheese. *International Dairy Federation, Bull. IDF* 53, 22–27.
- Yegin, S., Dekker, P., 2013. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science & Technology*. 93, 565–594. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0137-2>
- Yvon, M., Gitton, C., Chambellon, E., Bergot, G., Monnet, V., 2011. The initial efficiency of the proteolytic system of *Lactococcus lactis* strains determines their responses to a cheese environment. *International Dairy Journal* 21, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.010>

Index des tableaux

Tableau 1 : Composition d'un litre de lait d'après Snappe <i>et al.</i> , (2010) et Cataldi <i>et al.</i> , (2003).	30
Tableau 2 : Groupes microbiologiques et niveaux de population en unité formant colonie (UFC) par millilitres de lait frais (d'après Montel <i>et al.</i> , 2014).	31
Tableau 3 : Principaux composés tampon dans du caillé et leurs zones de pH tampon associées (Salaün, 2005).....	39
Tableau 4 : Principales protéases impliquées dans la protéolyse du fromage pendant l'affinage.	48
Tableau 5 : Techniques d'analyse des propriétés fonctionnelles évoquées dans la littérature et utilisées pendant la thèse.	51
Tableau 6 : Procédés de fabrication ayant servi à la mise au point de l'échantillonnage (MG=Matière Grasse, MAP=Matière Azotée Protéique, LS = lactosérum retiré pour le dé lactosage, E= eau ajoutée dans la cuve pour le dé lactosage, %= pourcentage par rapport au volume initial de lait dans la cuve, X g/kg = teneur en lactose cible dans le mélange caillé- lactosérum après dé lactosage).	72
Tableau 7 : Descriptions des expériences ayant permis de mettre au point le protocole de séparation du caillé et du LEG par tamisage.....	74
Tableau 8 : Description des expériences ayant permis de formaliser la méthode de prélèvement du mélange caillé-lactosérum.	77
Tableau 9 : Description de la mise en œuvre de l'expérience ayant permis la détermination du moment de prélèvement de l'échantillon de mélange caillé-lactosérum "après dé lactosage".	78
Tableau 10 : Randomisation des combinaisons de facteurs et des cuves non dé lactosées sur les 3 semaines de fabrication.....	80
Tableau 11 : Proportions de lactosérum retiré et d'eau ajouté en fonction du jour de fabrication et des objectifs de niveau et de mode de dé lactosage. LS= % de lactosérum retiré et E= % d'eau ajoutée.....	82

Tableau 12 : Variables sur lesquelles a été testé l'impact des facteurs et stades de prélèvement correspondant.....	93
Tableau 13 : Laboratoires sollicités en fonction du type d'analyse réalisé.	95
Tableau 14 : Références des normes de dosages des fractions azotées (NT, NS, NPN) dans le lait, le lactosérum, le caillé et le fromage.	101
Tableau 15 : Protocoles d'analyses microbiologiques.	103
Tableau 16 : Analyses et méthodes de recherches de bactéries pathogènes dans le fromage affiné.....	103
Tableau 17 : Analyses et méthodes de recherches de bactéries dans l'eau du réseau.	104
Tableau 18 : Descripteurs sensoriels des fromages affinés dégustés à chaud et à froid.	107
Tableau 19 : Coefficient de détermination, significativité et intersection des modèles linéaires des phases de diminution rapide (R) et de diminution lente (L) du débit de lactosérum lors du tamisage des échantillons prélevés avant et après délactosage.	114
Tableau 20 : Qualité microbiologique et sanitaire du lait frais à sa réception.....	132
Tableau 21 : Composition des laits standardisés avant ensemencement pour chacune des combinaisons de facteurs (MG= Matière Grasse, MAP=Matière Azotée Protéique, MS=matière sèche, FMAR=Flora Mésophile Aérobie Revivifiable).	132
Tableau 22 : Composition des fromages au démoulage.....	134
Tableau 23 : Valeurs moyennes et significativité des différences obtenues par ANOVA entre « Jour 1 » et « Jour 2 » (n=3) sur des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des fabrications non délactosées.....	135
Tableau 24 : Composition fine, caractéristiques physico-chimiques, rhéologie, indices de protéolyse et activités enzymatiques des fromages au démoulage.....	137
Tableau 25 : Rendements et coefficients de récupération pour chaque niveau et chaque mode de délactosage.	164
Tableau 26 : Caractéristiques physico-chimiques, indices de protéolyse et niveaux de populations bactériennes des fromages en fin d'affinage (n=6).	167
Tableau 27 : Corrélations de variables mesurées au démoulage avec le pH en fin d'affinage.	170

Tableau 28 : Valeurs moyennes de module de déformabilité (MD), déformation à la fracture (Df), contrainte à la fracture (Cf) et d'énergie à la fracture (Wf) et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque paramètre.....	180
Tableau 29 : Valeurs moyennes des aptitudes culinaires pour chaque niveau et chaque mode de délactosage, et significativité de l'impact du paramètre de délactosage sur chacune des aptitudes mesurées.....	186
Tableau 30 : Notes moyennes et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque descripteur sensoriel étudié à température ambiante.....	191
Tableau 31 : Notes moyennes et significativité de l'impact du niveau et du mode sur chaque descripteur sensoriel étudié à chaud.....	196
Tableau 32 : Coefficient de détermination, racine de la moyenne des carrés des erreurs (RMCE) et RMCE normalisé des propriétés fonctionnelles modélisées par PLS en fonction des variables mesurées au démoulage.....	213
Tableau 33 : Coefficient de détermination, racine de la moyenne des carrés des erreurs (RMCE) et RMCE normalisé des propriétés fonctionnelles modélisées par régression linéaire en fonction du niveau de délactosage ([lactose] du caillé avant soutirage).	214
Tableau 34 : Volume d'eau économisé annuellement par un site transformant 500 000 L de lait par jour en remplaçant LS=E par LS>E.	217
Tableau 35 : Différence de coût de la consommation d'électricité nécessaire pour concentrer le lactosérum de 6 % de MS à 20 % de MS en fonction du niveau de délactosage et du procédé de concentration en remplaçant LS=E par LS>E.....	218
Tableau 36 : Différence de coût total de mise en œuvre du délactosage en remplaçant LS=E par LS>E en fonction du niveau de délactosage et du procédé de concentration.....	218

Index des figures

Figure 1 : Nomenclature des variétés fromagères à coagulations lactique, enzymatique et mixte proposée par Almena-Aliste & Mietton (2014). PNCC = pressed noncooked cheese, PSCC = pressed semicooked cheese, PCC = pressed cooked cheese, PFC = pasta filata cheese.	26
Figure 2 : Schéma général de la transformation du lait en fromage (Mietton et al., 2004)....	27
Figure 3 : Structure micellaire d'après Dalgleish & Corredig (2012), montrant les caséines α et β (orange), liées aux nanoclusters de phosphate de calcium (sphères grises), les β -caséines mobiles à liaisons hydrophobes (bleu), les para- κ -caséines (vert) et les caséino-macropéptides (noir).....	29
Figure 4 : Représentation cyclique d'une molécule de lactose (liaison β 1,4).	33
Figure 5 : Répartition de l'eau dans un gel présure (GPE = grande porosité extramicellaire, PPE = petite porosité extramicellaire) (Lablée, 1989 ; Tarodo de la Fuente <i>et al.</i> , 1999).....	35
Figure 6 : Évolution de la teneur en lactose dans le lait, le lactosérum et la phase aqueuse du caillé lors de la fabrication de Cheddar (Huffman 1985) (\downarrow = ajout d'eau dans la cuve).	37
Figure 7 : Impacts en cuve du délactosage sur les propriétés du fromage au démoulage.	59
Figure 8: Impacts en cuve du délactosage sur le déroulement de l'affinage.	61
Figure 9 : Impacts potentiels du délactosage sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage.	62
Figure 10 : Questions de recherche et stratégie de la thèse.	68
Figure 11 : Toile de moule à Saint-Paulin.....	73
Figure 12 : Sous-échantillonnage du caillé tamisé avec trois couples vitesse/durée de mixage (Fabrication INRAE Raclette).	75
Figure 13 : Comparaison des protocoles de sous-échantillonnage par mixage du caillé refroidi et avec la méthode du répartiteur (Fabrication INRAE Raclette).	75
Figure 14 : Répartition du caillé tamisé avec un répartiteur.	76
Figure 15 : Comparaison des protocoles de création de sous-échantillonnage par mixage du caillé à chaud et à froid et avec la méthode avec le répartiteur (fabrication INRAE Raclette).	76

Figure 16 : Diagramme technologique de fabrication des Raclettes. Les étapes en bleu sont adaptées à chaque combinaison de facteurs (LS = proportion de lactosérum retiré pour le délactosage ; E = proportion d'eau ajoutée).....	79
Figure 17 : Temps technologiques réalisés entre la fin du décaillage (0 min) et le soutirage.	83
Figure 18 : Découpage et pressage du caillé issu d'une cuve de fabrication.....	83
Figure 19 : Suivi analytique pendant la fabrication (MG=Matière Grasse, MS=Matière Sèche, NT=azote total, NS=azote soluble, NPN=azote non protéique, FMAR=Flore Mésophile Aérobie Revivifiable, LAB=bactéries lactiques, CUVC=compression uniaxiale à vitesse constante). ...	85
Figure 20 : Suivi analytique pendant l'affinage (MG=matière grasse, ES=extrait sec, NT=azote total, NS=azote soluble, NPN=azote non protéique, LAB=bactéries lactiques, LBHF=lactobacilles hétérofermentaires facultatifs).....	86
Figure 21: Points de prélèvements fin brassage 1, après délactosage et avant soutirage en fonction des temps technologiques réalisés.....	87
Figure 22 : Protocole de prélèvement, d'échantillonnage et de sous-échantillonnage du caillé et du lactosérum.	88
Figure 23 : Schéma d'échantillonnage des fromages depuis le pré-pressage jusqu'à fin affinage. Les figures de même couleur sur un même fromage font partie du même échantillon.....	89
Figure 24 : Espace colorimétrique CIE, coordonnées Lab.....	106
Figure 25 : Évolutions du débit de lactosérum s'écoulant du tamis en fonction du temps au cours du tamisage d'échantillons de 1 L et 3 L prélevés avant (n=4) et après délactosage (n=4).	111
Figure 26 : Quantités de caillé obtenues après 60 s de tamisage (n=4 pour chaque modalité).	112
Figure 27 : Évolutions du débit de lactosérum s'écoulant du tamis en fonction du temps au cours du tamisage d'échantillons de 1 L avant délactosage (n=4) et 3 L après délactosage (n=4).	113
Figure 28 : Modélisation de la chute et de la stabilisation du débit de lactosérum au cours du tamisage d'échantillons de 1 L prélevés avant délactosage et de 3 L prélevés après délactosage.	114
Figure 29 : Évolution de la concentration en lactose du lactosérum s'écoulant du tamis au cours du tamisage.	116

Figure 30 : Quantités moyennes de caillé obtenues après tamisage (60 s) en fonction de la modalité de délactosage, du volume et du stade de prélèvement (n=5).....	118
Figure 31 : Quantités moyennes de caillé obtenues après tamisage (60 s) en fonction du volume et du stade de prélèvement (n=5). Tableau : Écarts moyens de quantités de caillé obtenues entre les échantillons prélevés avant et après délactosage pour chaque combinaison.	119
Figure 32 : Teneur en MS des échantillons de caillé tamisé en fonction de la modalité de délactosage, du stade et du volume de prélèvement (n=5) (différences significatives (*) et non significatives (N.S.) entre deux volumes de prélèvement avec p = 5 %).	120
Figure 33 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés après mixage selon 3 couples vitesse/durée.	122
Figure 34 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés par mixage à chaud et à froid.	123
Figure 35 : Variation de la teneur en MS de sous-échantillons créés par le répartiteur et par le mixage à froid.....	124
Figure 36 : Proportions moyennes de caillé tamisé par rapport au poids de l'échantillon de caillé-lactosérum prélevé directement dans la cuve ou par la vanne de soutirage (n=15) (Différence significative (*) déterminée avec p = 5%).	126
Figure 37 : Représentation de la cuve de fabrication vue du dessus et de la rotation des brassoires.	127
Figure 38 : Proportions moyennes de caillé tamisé par rapport au poids de l'échantillon de caillé-lactosérum prélevé dans le sens du courant et à contre-sens, avant et après délactosage (n=10) (différence non significative (N.S.) déterminée avec p = 5%).	128
Figure 39 : Évolution de la concentration en lactose dans le lactosérum de fabrications délactosées suivant trois niveaux : Non dél. (n=1), 41 g/kg (n=2) et 32 g/kg (n=2) entre la fin du décaillage (0 minutes) et le soutirage (45 minutes).	130
Figure 40 : Concentrations moyennes et écart-types des teneurs en lactose en fonction du procédé de fabrication (N.S.= différences non significatives).	133
Figure 41 : Évolutions de la teneur en ESD du lait, du caillé tamisé et du fromage en début d'affinage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.....	139

Figure 42 : Concentrations en lactose, galactose et glucose au démoulage (24 h) et à 48 h (Différentes lettres indiquent une différence significative avec $p < 0,05$).	140
Figure 43 : Évolutions des concentrations en lactose, galactose et glucose dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps (a) et focus sur l'évolution du lactose dans le caillé tamisé entre le début du dé lactosage et le soutirage de la cuve (b).....	141
Figure 44 : Évolutions des concentrations en lactose dans le caillé (dont LIG) (a) et évolutions des concentrations en lactose dans le LIG (b).....	142
Figure 45 : Évolutions des concentrations en galactose et glucose dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.	144
Figure 46 : Évolutions de la concentration en acide lactique dans le lait, le caillé tamisé et le fromage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.	146
Figure 47 : Évolutions des populations de lactocoques et leuconostocs dans le caillé pendant la fabrication en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.....	148
Figure 48 : Évolutions du pH du lait, du caillé tamisé et du fromage en début d'affinage en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.	149
Figure 49 : Évolutions de la teneur en calcium total (a) et de la teneur en phosphore total (b) sur l'ESD en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.	152
Figure 50 : Évolutions du taux de calcium soluble par rapport au calcium total (a) et du taux de phosphore soluble par rapport au phosphore total (b) en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.....	154
Figure 51 : Évolutions de la concentration en citrates dans le caillé en fonction du temps à partir de l'ensemencement de la cuve.....	155
Figure 52 : Indice de pouvoir tampon (dB/dpH) en fonction du pH au cours de la titration des échantillons avec NaOH.....	157
Figure 53 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non dél. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 5 jours d'affinage présentant les protéines codées en vert et la matière grasse codée en rouge.....	161
Figure 54 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non dél. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 5 jours d'affinage (MG en rouge, éléments encadrés = globules gras coalescents).....	162

Figure 55 : Surface occupée par les globules gras les plus gros (3e quartile) par rapport à la surface de MG totale mesurée sur les images de microscopie confocale (3 images analysées par modalités présentées en Annexe 14).	163
Figure 56 : Quantités moyennes d'eau ajoutée pour le dé lactosage (a) et quantités moyennes calculées de lactosérum produit (b) dans chaque fabrication (~310 L de lait) en fonction des paramètres de dé lactosage.....	165
Figure 57 : Évolution du pH en fonction du niveau de dé lactosage et en fonction du temps d'affinage à partir du dé moulage.....	169
Figure 58 : Évolutions des populations de lactocoques (a) et leuconostocs (b) au cours de l'affinage.....	172
Figure 59 : Aires relatives correspondant aux caséines α -S1, caséines α -S2, caséines β et caséines κ , par rapport à l'aire totale du spectre chromatographique.	173
Figure 60 : Profils peptidiques des fromages 32 g/kg LS=E (a), 41 g/kg LS>E (b), 32 g/kg (c), Non dél. (d), 41 g/kg (e) à partir d'échantillons filtrés sur 0,2 μ m.	174
Figure 61 : Profils peptidiques des fromages 32 g/kg LS=E (a), 41 g/kg LS>E (b), 32 g/kg (c), Non dél. (d), 41 g/kg (e) à partir d'échantillons filtrés sur 3 kDa.	175
Figure 62 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non dél. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) à 60 jours d'affinage présentant les protéines codées en vert et la matière grasse codée en rouge.....	177
Figure 63 : Images par microscopie confocale à balayage laser des fromages Non dél. (a), 42 g/kg LS>E (b), 42 g/kg LS=E (c), 31 g/kg LS>E (d) et 32 g/kg LS=E (e) en fin d'affinage (MG en rouge, éléments encadrés = globules gras coalescents).....	178
Figure 64 : Surface occupée par les globules gras les plus gros (3e quartile) par rapport à la surface de MG totale mesurée sur les images de microscopie confocale (3 images analysées par modalités présentées en Annexe 15).	179
Figure 65 : Aspect des échantillons de fromage affiné après compression.	181
Figure 66 : Représentation par ACP des paramètres de dé lactosage (a) et des propriétés fonctionnelles mesurées à température ambiante ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le dé lactosage (b).	182

Figure 67 : Représentation par ACP des paramètres de délactosage (a) et des propriétés fonctionnelles mesurées à chaud ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le délactosage (b).	187
Figure 68 : Représentation par ACP des descripteurs sensoriels étudiés à température ambiante par rapport aux niveaux de délactosage.	192
Figure 69 : Représentation par ACP des paramètres de délactosage (a) et des descripteurs sensoriels à température ambiante ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le délactosage (b).	195
Figure 70 : Représentation par ACP des descripteurs sensoriels étudiés à chaud par rapport aux niveaux de délactosage.	197
Figure 71 : Représentation par ACP des paramètres de délactosage (a) et des descripteurs sensoriels à chaud ainsi que les variables explicatives affectées significativement par le délactosage (b).	198
Figure 72 : Schéma des impacts du niveau et du mode de délactosage sur les propriétés du fromage et le rendement au démoulage.	206
Figure 73 : Schéma des impacts du niveau et du mode de délactosage sur le déroulement de l'affinage du fromage.	208
Figure 74 : Schéma des impacts du niveau et du mode de délactosage sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles du fromage affiné.	211